

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ – UNIVALI
CENTRO DE EDUCAÇÃO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS, DA TERRA E DO
MAR – CTTMar
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA AMBIENTAL
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL

OCORRÊNCIA DE *Listeria* sp, EM AMOSTRAS DE PESCADO E
AMBIENTE DE INDÚSTRIA DE PROCESSAMENTO E
COMERCIALIZAÇÃO DE PESCADO DO
LITORAL DE SANTA CATARINA

JONAS CUNHA ESPÍNDOLA

Dissertação submetida à Universidade do Vale do
Itajaí – UNIVALI, como requisito final à
obtenção do título de Mestre em Ciência e
Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Bacellar Barreiros

Itajaí, SC, Março de 2004

“Ocorrência de *Listeria* sp. em amostras de pescado e ambiente de indústria de processamento e comercialização de pescado do Litoral de Santa Catarina”

JONAS CUNHA ESPÍNDOLA

Esta Dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, Área de Concentração em Tecnologia e Gestão Ambiental, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado Acadêmico em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade do Vale do Itajaí.



Prof. Paulo Ricardo Schwingel, Doutor
Coordenador do Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia Ambiental

E foi apresentada perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:



Prof. Marco Antônio Bacellar Barreiros, Doutor (UNIVALI)
Presidente/Orientador



Prof. Maurício Laterça Martins, Doutor (Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC)
Convidado Externo



Profª. Laura Isabel Weber da Conceição, Doutor (UNIVALI)
Convidada



Prof. André Oliveira de Souza Lima, Doutor (UNIVALI)
Convidado

Itajaí(SC), 1º de setembro de 2004.

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra a todos que procuram e fazem o conhecimento.

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente a Deus.
- Ao Prof. Marco Antônio B. Barreiros, pela orientação e dedicação dispensadas a este trabalho.
- Aos colegas de laboratório, pela ajuda e companheirismo.
- Ao amigo Robert Lenocho pela disposição que tanto admiro, servindo de estímulo nas horas mais difíceis. Um muito obrigado é muito pouco para expressar a minha gratidão.
- À Prof^a. Laura pela contribuição a esta obra.
- Aos meus pais Jacób e Maria, sem vocês nada seria possível.
- Ao meu irmão Misael, pelo incentivo.
- À minha noiva Stelamaris pelo seu carinho, compreensão e amor.
- À UNIVALI – Universidade do Vale do Itajaí.
- Ao Colégio Agrícola Senador Carlos Gomes de Oliveira.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE ABREVIACÕES.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Contextualização.....	1
1.2 Contaminação bacteriana em pescado.....	1
1.3 Saúde Pública.....	2
1.4 O Sistema HACCP.....	5
1.5 O Gênero <i>Listeria</i>	7
1.6 Incidência de <i>Listeria</i>	8
1.7 Emprego Do Frio Em Alimentos.....	10
1.8 Detecção e Identificação.....	12
1.8.1 Métodos Bacteriológicos.....	12
1.8.2 Métodos Genéticos.....	15
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 Matéria Prima.....	19
3.2 Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	20
3.3 Procedimento de identificação de colônias.....	21
3.4 Preparação do DNA.....	23
3.5 Oligonucleotídeos iniciadores.....	23
3.6 Amplificação e Eletroforese.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
6. CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS.....	34
ANEXOS.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura – 1 Microfotografia demonstrando a morfologia e coloração de Gram de <i>Listeria monocytogenes</i> . A seta indica a característica de bastonetes curtos Gram positivos (http://www2.mf.uni-lj.si/~mil/bakt3/bakt3.htm).....	7
Figura 2 – Preparo do caldo de enriquecimento para incubação da <i>L. monocytogenes</i> (foto do autor).....	20
Figura 3 – Demonstração do teste do API – <i>Listeria</i> com a fermentação dos carboidratos inoculados com <i>Listeria monocytogenes</i> (foto do autor).....	21
Figura 4 – Caldo de enriquecimento para <i>Listeria</i> sp incubado por 48h/30°C, após homogeneização com amostra de pescado (foto do autor).	22
Figura 5 – Crescimento característico das colônias de <i>Listeria monocytogenes</i> em meio Palcam (foto do autor).	22
Figura 6 – Inoculação do meio de enriquecimento para o plaqueamento da amostra incubada em placas de ágar Oxford (verde) e Palcam (vermelho) (foto do autor).....	23
Figura 7 – Resultado das análises obtidas nos dois métodos utilizados convencional e PCR.	28
Figura 8 – Gel de agarose com produtos de amplificação das cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> isoladas de amostras ambientais provenientes de abatedouros do estado do Paraná. As setas indicam o <i>amplicom</i> de 626bp. Padrão (P) ladder 100 pb, branco (B) e controle positivo (C) (foto do autor).....	29
Figura – 9 Amostra de ambiente positiva para <i>Listeria</i> sp detectada através da PCR. A seta indica o produto característico amplificado com 626 bp, (P) ladder 100bp, (B) branco e (C) controle positivo <i>Listeria monocytogenes</i> (foto do autor).....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resistência de <i>Listeria monocytogenes</i> à temperatura, nos diferentes alimentos. Valores: lagosta 5,0°C, Caranguejo azul 8,40°C em trypticase Ágar de soja, lagostim 5,5°C, mexilhão 4,25°C, salmão 5,6°C, bacalhau 5,7°C.	11
Tabela 2 – Reações típicas das diversas espécies de <i>Listeria</i> . V=variável, AS= <i>S. aureus</i> , RE= <i>R. equi</i> , LM= <i>Listeria monocytogenes</i> , LIVA= <i>L. ivanovii</i> , LINN= <i>L. innocua</i> , LW= <i>L. welshimeri</i> , LS= <i>L. seeligeri</i> , LG= <i>L. grayi</i>	13
Tabela – 3 Origem das amostras colhidas para isolamento e identificação de <i>Listeria</i> sp. através de metodologia convencional e PCR.....	19

LISTA DE ABREVIACÕES

- AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism.
- AOAC - Official Methods of Analysis of AOAC International
- AP – Agar palcam
- ATN – ácido nalidíxico.
- BLED – Caldo enriquecido tamponado *Listeria*.
- CAC – Comissão do Codex Alimentarius.
- dATP – 2'-desoxiadenosina 5'- trifosfato
- dCTP – 2' – desoxicitidina 5' - trifosfato
- dGTP – 2' – desoxiguanosina 5' – trifosfato
- Dnase – desoxiribonuclease
- dNTPs – desoxinucleotídeos trifosfatados
- DTT – ditioneitol
- dTTP – 2' – desoxitimidina 5' – trifosfato
- EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
- FAO – Food and Agriculture Organization
- FDA - Food and Drug Administration
- FSEP - Agriculture Canada's Food Safety Enhancement Program.
- HACCP - Hazard Analysis and Critical Control Point.
- Lis1 – *primer* 5' - CCTGATGCAACAAAAGGGAC-3'
- Lis2 – *primer* 5' - TGATAAAGTTGAGCAGCGGC -3'
- MX - Modified Oxford medium
- ng – nanograma
- NaCl – cloreto de sódio
- OMS – Organização Mundial da Saúde.
- OX – Agar Oxford
- p/v – peso volume
- pb – pares de base
- PCR – reação em cadeia pela polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

QMP - Quality Management Program

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA.

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism.

RNA – ácido ribonucleico

RNase – ribonuclease

RT – transcrição reversa

SCAR – Sequence Characterized Amplified Regions.

SDS – dodecil sulfato de sódio

STS – Sequence Tagged Sites.

Taq – *Thermus aquaticus*

TBE – tampão tris-borato/EDTA

TSAYe – Agar soja tripticase.

TSBye – Caldo soja tripticase.

UFC – Unidade Formadora de Colônia.

USDA - US Department of Agriculture

UVM – ácido nalidixico e acriflavina. (caldo da Universidade de Virmont)

V – volts

v/v – relação volume/volume

VM-VP – Vermelho de Metila e Voges Proskauer.

VNTR – Variable Number of Tandem Repeats.

RESUMO

A listeriose é uma doença que pode ser transmitida por alimentos e que freqüentemente afeta mulheres grávidas, recém-nascidos, crianças e adultos com o sistema imunológico debilitado. Entre os alimentos associados com a transmissão de *Listeria monocytogenes*, estão: o leite e derivados, carnes, carnes industrializadas, vegetais e pescados. Neste trabalho foi determinada a ocorrência de *Listeria* sp. pelo método bacteriológico e também pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Em amostras de 8 estabelecimentos no período entre março e novembro de 2003. De cada um coletou-se das bancadas de processamento, serra fita, parede, câmara de resfriamento, câmara de congelamento, ralo e do piso. As amostras ambientais da indústria correspondem a 66,21%, amostras de peixes congelados 33,8% e 11 amostras de abatedouros de bovinos previamente identificadas. Das 74 amostras analisadas pelos testes convencionais, 3 amostras de pescado congelado apresentaram-se positivas para *Listeria* sp correspondendo a uma ocorrência de 12% nestas amostras e 4,1% do total de amostras analisadas. Pela PCR foram obtidas 11 (16,41%) amostras positivas, sendo 5 de ambientes de indústrias de pescado, 1 de pescado congelado e 5 de ambiente de abatedouros. Entre as amostras isoladas de pescado em Santa Catarina, 1 (4%) foi identificada como *Listeria innocua* e 2 (8%) como *Listeria monocytogenes*. Entretanto, 8 cepas de *Listeria* sp isoladas não apresentaram amplificação com os *primers* utilizados, sugerindo variabilidade genética entre as cepas estudadas.

Palavra-chave: *Listeria monocytogenes*, PCR, pescado

ABSTRACT

The listeriosis is a disease that can be transmitted by food and that frequently affects pregnant women, newborn, children and adult with the weakened immune system. Several foods can be associates with transmission *Listeria monocytogenes*, are: the milk and derivatives, meats, industrialized meats, vegetable and fishes. In this work was certain occurrence *Listeria* sp. for bacteriological method and also by was used polymerase chain reaction (PCR). In samples of 8 establishments in the period between march and november 2003. Of each one it collected of the processing row of seats, ribbon saw, wall, cooling chamber, freezing chamber, drain and of the floor. The environmental samples of the industry correspond to 66,21%, samples of frozen fishes 33,8% and 11 slaughterhouses samples of bovine previously identified. Of the 74 samples analyzed by the conventional tests, 3 samples of frozen fish they introduced positive for *Listeria* sp corresponding to an occurrence of 12% in samples and 4,1% from the total of analyzed samples. By PCR were obtained 11 (16,41%) positive samples, being 5 of fish industries environments, 1 of frozen fish and 5 of slaughterhouses environment. Among samples positive in frozen fish of Santa Catarina state, 1 (4%) was identified like *Listeria innocua*, 2 (8%) like *Listeria monocytogenes*. However, 8 *Listeria* sp strains isolated didn't showed amplification with primers used in this work, suggesting genetic variability among strains analized.

Key-word: *Listeria monocytogenes*, PCR, fish

1. INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização

A qualidade do pescado pode ser comprometida com relativa facilidade por ação dos microrganismos, enzimas autolíticas e autooxidação lipídica devido ao seu alto teor de umidade. Entende-se por pescado: peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, quelônios e mamíferos de água doce ou salgada usados na alimentação humana. A temperatura ambiente é um dos fatores que mais influenciam no crescimento dos microrganismos, havendo uma certa faixa onde determinadas espécies têm a capacidade de se desenvolverem (OGAWA, 1999).

Segundo Huss *et al.* (1999) os pescados podem ser classificados de acordo com o risco.

Risco alto:

- Moluscos frescos e congelados, tais como mexilhões e ostras;
- Peixe cru;
- Peixes levemente conservados $\text{NaCl} < 6\%$ e $\text{pH} > 5,0$. Neste grupo incluem-se os salgados, marinados, fermentados e congelados defumados;
- Processados pelo calor, pasteurizados, cozidos e defumados quentes.

Risco baixo:

- Peixes semi-preservedos: $\text{NaCl} > 6\%$ e $\text{pH} < 5,0$. Neste grupo incluem-se os peixes salgados, marinados, caviar e peixes fermentados;
- Processados pelo calor esterilizados e enlatados;
- Peixe seco e seco defumado;
- Peixes e crustáceos refrigerados e congelados.

1.2 Contaminação bacteriana em pescado

Músculos, órgãos e líquido corporal de peixes vivos saudáveis são assépticos, enquanto que a pele, guelras e vísceras, que têm contato direto com a água, apresentam um razoável nível de contaminação, especialmente por bactérias. Cerca de 90% do ambiente marinho apresenta temperaturas abaixo de 5°C e conseqüentemente, a maioria das bactérias

estão incluídas no grupo das psicrofílas. Muitas bactérias desenvolvem-se a 0°C, mas de forma muito lenta (OGAWA, 1999).

O pescado é um dos alimentos mais susceptíveis à autólise, oxidação e hidrólise das gorduras. As alterações de sabor, odor, textura e cor refletem o nível de frescor ou decomposição causado, principalmente, pela atividade microbiana. A velocidade na decomposição é influenciada pelo número inicial e pelo tipo de bactérias presentes e pelas condições de armazenamento, tais como umidade, temperatura e atmosfera gasosa (NICKELSON & FINE, 1992).

Quando o pescado é capturado e colocado a bordo, o número de bactérias do pescado aumenta devido à contaminação a bordo que chega a atingir 10^5 a $10^6/\text{cm}^2$. Após a classificação e separação, se for efetuada uma boa lavagem com água do mar, as bactérias são reduzidas para 1/3 a 1/10, comparado ao momento antes da lavagem. Posteriormente, muitas outras fontes de contaminação alteram a microbiota original, aumentando o número de bactérias antes do pescado chegar à mesa do consumidor. Tais fontes de contaminação incluem a colocação do pescado em urnas com gelo ou congelado, o uso de aparelhos sem a assepsia adequada, a manipulação humana em mercados, peixarias e no transporte (OGAWA, 1999).

1.3 Saúde Pública

Segundo Bersot (2002) a importância para a saúde pública está no fato da *Listeria monocytogenes* causar severas infecções em humanos e em animais caracterizada por meningite, septicemia ou aborto. Os indivíduos preferencialmente atingidos são os neonatos, as gestantes e os imunodeprimidos. O índice de mortalidade nesses casos pode variar de 20 a 30%. As gestantes geralmente não apresentam sintomatologia característica, podendo ocorrer em alguns casos sintomas semelhantes a um resfriado, com febre, mialgia e cefaléia. Através da corrente sanguínea da mãe, o microrganismo atinge o feto (infecção transplacentária) causando aborto geralmente no terceiro trimestre de gestação, ou doença no neonato. Outra forma de contaminação dos neonatos ocorre durante a passagem pelo canal vaginal. O período de incubação é de 10-20 dias, com desenvolvimento posterior de meningite. Cerca de 11% dos neonatos acometidos por meningite podem apresentar seqüelas. Nos indivíduos imunossuprimidos ou idosos geralmente ocorre meningite ou meningoencefalite, devido ao tropismo do microrganismo pelo sistema nervoso central. Outra forma comum da doença

esses indivíduos é a septicemia. Também tem sido relatada a forma gastroentérica, em decorrência ao consumo de alimentos contaminados. A incidência de listeriose em gestantes varia, de acordo com relatos, de 4,7-30 casos por 100.000 nascimentos. Em pacientes transplantados este valor sobe para 200 casos/100.000; pacientes com câncer, 13 casos/100.000; indivíduos com mais de 65 anos, 1,4 casos/100.000 e em indivíduos aidéticos a incidência varia de 52-115 casos/100.000 aidéticos. Considerando o conjunto dos indivíduos afetados, em torno de 30% pode apresentar seqüelas. Em humanos sadios, estima-se que 5% sejam portadores intestinais da *L. monocytogenes*.

No período de abril a dezembro de 1985, foram observados cinco casos de listeriose em transplantados renais num mesmo hospital de São Paulo, SP. Os pacientes eram adultos (média de 40,6 anos) tendo como queixa básica a febre. Laboratorialmente, em todos foi encontrada *L. monocytogenes*, dos sorotipos 1/2a 4b. As amostras do sorotipo 4b apresentaram o mesmo perfil de resistência aos antibióticos, sendo resistentes a cefoxitina, clindamicina, oxacilina e penicilina (HOFER *et al.*, 1999).

A listeriose é uma doença que pode ser transmitida por alimentos e que frequentemente afeta mulheres grávidas, recém-nascidos, crianças e adultos com o sistema imunológico debilitado. Vários alimentos podem estar associados com a sua transmissão, entre eles pode-se citar: o leite e derivados, carnes, carnes industrializadas, vegetais e pescados (HUSS *et al.*, 1999).

Devido a *L. monocytogenes* ser uma bactéria de grande importância na saúde pública e tendo como vários casos clínicos de intoxicação, meningite e aborto, considera-se, preocupante devido à alta taxa de mortalidade, a ampla distribuição na natureza e em produtos *in natura*, a sua capacidade de se estabelecer em vários ambientes de processamento através da formação de um biofilme e ao fato de multiplicar-se em temperaturas de refrigeração (MURIANA, 1996).

Os serviços de inspeção sanitária e controle de produtos industrializados desempenham um papel importante no contexto de saúde pública com a finalidade de prevenir toxinfecções bacterianas, porém, isto nem sempre ocorre. Sendo assim, o pescado pode vir a ser um importante veiculador de agentes patogênicos responsáveis por diversas enfermidades, entre elas a listeriose (GERMANO *et al.*, 1993).

Outro fator de risco para a saúde pública é o consumo de peixes e frutos do mar ao natural, uma vez que o pescado pode dispor de variada gama de microrganismos patogênicos. Um exemplo disto é o “Ceviche”, alimento feito à base de peixe cru e temperado com limão, muito apreciado na América do Sul. Por esta razão, Fuchs & Sirvas (1991) pesquisaram a

ocorrência de *Listeria* em “ceviche” comercializado nas feiras de Lima no Peru. Aproximadamente 75% das amostras analisadas continham *L. innocua* e 9 % das amostras apresentavam células de *L. monocytogenes*.

Os surtos de listeriose, comparados com outros patógenos de origem alimentar, tais como *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni* e *Escherichia coli* 0157: H7, não são tão altos, mas tem a maior razão de mortes por casos (BEAN & GRIFFIN, 1990). Segundo Schuchat *et al.*, (1992), este número vem aumentando no mundo inteiro. Uma estimativa nos EUA, é que ocorrem 1.850 casos anualmente, aonde um a cada quatro indivíduos vão a óbito.

Rocourt (1996) reafirma que a prevenção da contaminação da *L. monocytogenes* nos alimentos se dá através da aplicação de HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point), e da educação dos manipuladores de alimentos sobre segurança alimentar.

Medidas de controle na indústria:

- HACCP

No comércio:

- separar alimentos crus de alimentos prontos para o consumo;
- higiene e sanificação das instalações e equipamentos;
- controle da temperatura de armazenamento e exposição (<5°C);
- monitoramento da data de validade de produtos

Para o consumidor:

- manter o refrigerador limpo;
- lavar bem os vegetais que serão consumidos crus;
- rejeitar produtos fora do prazo de validade;
- armazenar alimentos perecíveis na parte mais fria do refrigerador;
- evitar manter alimentos por mais de 3 dias no refrigerador;
- evitar o consumo de produtos de origem animal crus ou mal cozidos;
- evitar contaminação cruzada no preparo e na estocagem dos alimentos;
- aquecer sobras de alimentos em temperaturas elevadas;
- evitar consumo de queijos macios e patês vendidos a granel.

A Comissão do Codex Alimentarius (CAC) foi criada em 1962 por decisão da FAO e da OMS. O Codex Alimentarius é uma coleção de códigos de práticas e padrões para alimentos, apresentados de maneira uniforme. Seus objetivos são o estabelecimento de códigos de práticas e padrões para proteger a saúde do consumidor e garantir práticas justas no comércio de alimentos, além de orientação e estímulo ao estabelecimento de definições e

exigências para alimentos visando promover sua harmonização e facilitar o comércio internacional. No Brasil, as atividades do Comitê Codex Alimentarius do Brasil (CCAB) são coordenadas pelo INMETRO. Este comitê possui como membros órgãos do governo, indústrias, entidades de classe e órgãos de defesa do consumidor. O Codex Alimentarius é um ponto de referência mundial de grande relevância para consumidores, produtores, fabricantes de alimentos, organismos nacionais de controle de alimentos e o comércio internacional de alimentos. No Codex, os países participam na harmonização e aplicação de normas relativas aos alimentos em escala mundial, além da possibilidade de participarem na elaboração de normas alimentares de uso internacional.

1.4 O Sistema HACCP

Segundo sua concepção, o HACCP possui inúmeras vantagens em relação ao processo tradicionalmente usado de inspeção alimentar. No processo tradicional, a inspeção baseia-se nos sentidos da visão, olfato e tato para detectar perigos, sendo somente concebida quando os perigos eram a contaminação macroscópica e os animais doentes. Trata-se de um processo reativo, um sistema *feedback*, onde ações são tomadas apenas quando o problema “erro” é detectado. Entende-se como “erro”, a ocorrência de perigos que podem ser químicos, físicos e biológicos. Com isto, contaminantes microbianos e químicos não são detectados pelo inspetor. O sistema HACCP, ao contrário da inspeção tradicional, é preventivo (sistema *feedforward*), onde ações são tomadas antes que o problema “erro” ocorra. Neste sistema é feita a determinação da etapa (ou etapas) do processo onde o risco da ocorrência de perigos é maior. Ele concentra o controle nos pontos críticos para garantir a inocuidade do produto. Como é possível observar, a garantia da inocuidade de alimentos com o uso do sistema HACCP é muito superior do que com o uso do método tradicional de inspeção. Dentro do escopo das normas, diretrizes e recomendações do Codex consta o “Código de Práticas Internacionais Recomendadas em Princípios Gerais de Higiene Alimentar”. Este código é reconhecido mundialmente como essencial para garantir a inocuidade e a segurança dos alimentos, sendo recomendado aos governos, indústria e consumidores. Os objetivos dos Princípios Gerais de Higiene Alimentar do Codex são, *inter alia*, “recomendar uma abordagem baseada no sistema HACCP como um meio de aumentar a inocuidade alimentar”. Como resultado da citação da Comissão do Codex Alimentarius o sistema HACCP passou a ser referência para as exigências internacionais de inocuidade alimentar. O

sistema HACCP, que possui fundamentação científica, consiste em etapas sequenciais para identificar, avaliar e controlar perigos de contaminação de alimentos, da produção até o consumo. Seus objetivos são prevenir, reduzir ou minimizar os perigos associados ao consumo de alimentos, estabelecendo deste modo os processos de controle para garantir um produto inócuo. Tem como base a identificação dos perigos potenciais para a inocuidade do alimento e as medidas preventivas para controlar as situações que criam os perigos. É crescente a aceitação do sistema HACCP em todo o mundo, por indústrias, governos e consumidores. Eis as adoções mais relevantes:

- Em 1972, o FDA (*Food and Drug Administration*) implementou o HACCP para alimentos enlatados com baixa acidez. Hoje, o FDA e o USDA (*US Department of Agriculture*) exigem o HACCP para produtos pesqueiros desde Dezembro de 1995 e para Carnes e Aves desde Julho de 1996. Desde janeiro de 2001, o FDA exige que os produtores de sucos de frutas – americanos e estrangeiros – usem os princípios HACCP nos seus processos de industrialização. A mesma exigência se faz presente no caso da exportação de suínos.
- Com a publicação pelo governo brasileiro, em novembro de 1993, da portaria do Ministério da Saúde de nº 1428/93 ficou estipulado que todos os estabelecimentos que trabalham com alimentos são obrigados a adotar a sistemática de controle preconizada pelo método HACCP, a partir do ano de 1994.
- O Canadá introduziu em 1993, através do esforço conjunto com a indústria pesqueira, seu programa Quality Management Program (QMP). Este foi considerado o primeiro programa, no mundo, obrigatório de inspeção baseado em HACCP, em virtude de que cerca de 2000 planos HACCP foram aprovados. Agora esse país avança na implementação de seu Agriculture Canada's Food Safety Enhancement Program (FSEP), um sistema para a garantia da inocuidade de todos seus alimentos, o que estimula ainda mais a adoção do enfoque HACCP.
- Nos países de língua inglesa do Caribe, durante o período 1996-1999, foram realizados quatro cursos sobre inspeção de carnes vermelhas, aves e produtos pesqueiros, baseados na metodologia HACCP, atividades que permitiram a capacitação de 120 inspetores desta sub-região (FERMAM, 2004).

1.5 O Gênero *Listeria*

Os microrganismos do gênero *Listeria* são bactérias com a forma de bastonetes pequenos e regulares, gram-positivos (figura 1), não formadores de cápsula e esporo (SEELIGER & JONES, 1986). Em culturas jovens, os microrganismos podem formar cadeias curtas paralelas em forma de “V”. Em culturas velhas podem apresentar forma filamentosa e variabilidade de Gram.

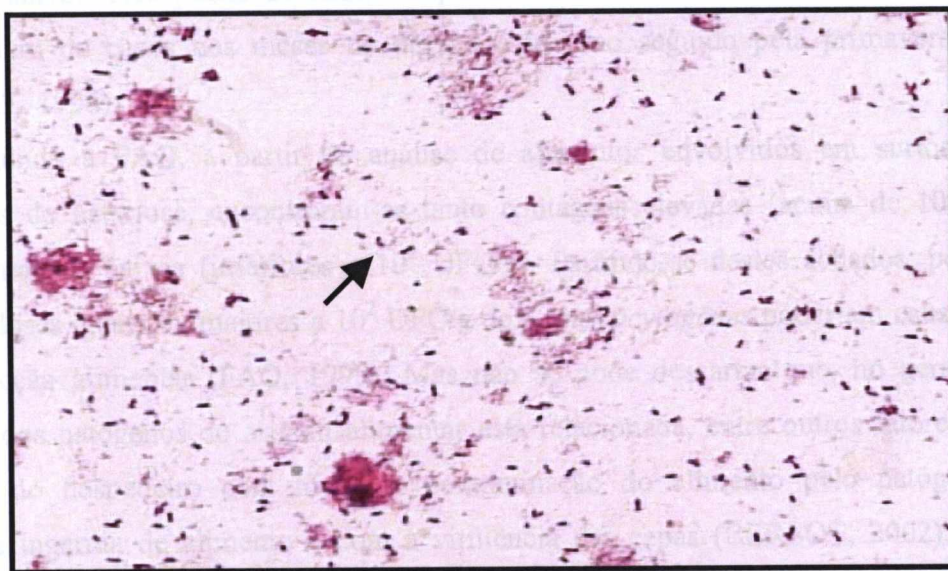


Figura – 1 Microfotografia demonstrando a morfologia e coloração de Gram de *Listeria monocytogenes*. A seta indica a característica de bastonetes curtos Gram positivos (<http://www2.mf.uni-lj.si/~mil/bakt3/bakt3.htm>).

Listeria monocytogenes permaneceu durante duas décadas após sua descoberta, como a única espécie reconhecida do gênero, até a descrição de *L. denitrificans* em 1948 (ROCCOURT *et al.*, 1987). As espécies são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em uma variedade grande de substratos e em muitas espécies de animais domésticos e agrícolas. *L. monocytogenes* é patogênica tanto para animais como para humanos. Um grupo de pesquisa em listeriose de origem alimentar da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1988), a considera como um microrganismo contaminante do ambiente, cuja forma de transmissão ocorre, principalmente, através de alimentos contaminados.

Bastante tolerantes ao sal, bactérias do gênero *Listeria* podem crescer em meios contendo 10% de cloreto de sódio e sobreviver por meses em uma solução com 25% de sal,

quantidades a 4°C (DOYLE & SCOENI, 1988). A tolerância da bactéria ao sal parece diminuir quando em presença de outros substratos. Em suco de repolho suplementado em diferentes concentrações de NaCl, a bactéria apresentou crescimento em concentrações de 2% de NaCl, mas não na presença de 5% de concentração (CONNER *et al.*, 1990).

Desde 1981, investigações de surtos e casos esporádicos de listeriose têm indicado claramente que alimentos contaminados são a fonte mais freqüente de transmissão da doença. Todavia, somente em 1988, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu que o consumo de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* seria fonte primária de transmissão da listeriose humana. As pertencentes ao sorogrupo 4 estão mais relacionadas a surtos, enquanto que as do sorogrupo 1/2 são mais detectadas em alimentos e envolvidas em casos esporádicos. Nos países de clima temperado ocorre variação sazonal da doença, com maior número de casos nos meses de outono e inverno seguido pela primavera e verão (ROCOURT, 1996).

Segundo a FAO, a partir da análise de alimentos envolvidos em surtos e casos esporádicos de listeriose, encontraram-se tanto contagens elevadas (acima de 10^3 UFC/g) quanto contagens baixas (inferiores a 10^2 UFC/g). Partindo-se destes achados, poder-se-ia dizer que doses iguais ou maiores a 10^2 UFC/g de *L. monocytogenes* poderiam causar quadro de toxinfecção alimentar (FAO, 1999). Mas não se pode descartar que, no geral, a dose infectante dos patógenos de origem alimentar está relacionada, entre outros fatores, com as condições do hospedeiro com nível de contaminação do alimento pelo patógeno, com quantidade ingerida de alimento e com a virulência das cepas (BERSOT, 2002). Segundo Deseo (1999), a contaminação de alimentos com níveis acima de 10^3 UFC/g é considerada alta para *L. monocytogenes*.

1.6 Incidência de *Listeria*.

Segundo Acha & Szyfres (1997), o gênero apresenta distribuição geográfica mundial. Desta forma, podem ser encontradas em diversos habitats, fazendo parte da microbiota indígena, de animais silvestres, ruminantes e seres humanos.

A detecção de *Listeria* sp. em amostras de água de rios, de plantas de tratamento de esgoto Montes, (1991), em canais e lagos que desembocam no mar Dijkstra, (1982), sugere que sejam estas as fontes de contaminação das áreas costeiras do mar (COLBURN *et al.*, 1990).

A sua principal via de transmissão são os alimentos contaminados, tais como vegetais, leite cru e derivados provenientes de má pasteurização, peixes, aves e carnes processadas (LORBER, 2000).

Os patógenos que são contaminantes de alimentos são comumente estressados durante o processamento do produto. Na manufatura do queijo, por exemplo, as bactérias existentes no leite cru resistem a uma série de estresses, incluindo o tratamento térmico, a adição de água oxigenada, a produção de ácidos pelos fermentadores e a adição de cloreto de sódio durante o processo de aquecimento. Ao investigar a adaptação, o crescimento e a resistência de *Listeria* até níveis letais, observou-se que a adaptação de *L. monocytogenes* frente a diferentes meios estressantes serve de eficiente mecanismo de proteção. Assim, para evitar essa adaptação bacteriana, as indústrias de alimentos necessitam modificar suas tecnologias ou implementar novas, que garantam a segurança dos alimentos produzidos (LOU & YOUSEF, 1997).

Desde 1985 epidemiologistas e microbiologistas indicam que os casos de listeriose têm como principal via de transmissão alimentos contaminados. Sendo que em frutos do mar, têm sido isoladas de produtos frescos, congelados, defumados e dessecados. Devido à sua habilidade de crescer em temperaturas de refrigeração, torna-se difícil determinar a dose mínima de infecção. Com isso, o U.S. Food and Drug Administration e o Departamento de saúde da Nova Zelândia criaram ações reguladoras, sendo que atualmente as indústrias são obrigadas a assegurar que os alimentos, assim como os mariscos, não contenham a *L. monocytogenes*. Os mariscos marinados são popularmente consumidos na Europa, Ásia e nas regiões do Pacífico, e apesar disso pouco se sabe a respeito da sobrevivência do microrganismo. Os resultados obtidos até recentemente mostraram que a presença da *Listeria* nos marinados não depende somente da composição de ácidos orgânicos do marinado, mas também das características físicas e químicas desses produtos, e que se faz necessário a exploração de testes que sejam iguais aos que ocorrem nos sistemas de alimentos (BREMER & OSBORNE, 1995a).

Destro *et al.* (1994) relatou a ocorrência de *L. monocytogenes* em camarões processados em indústrias brasileiras. De 178 amostras analisadas, 89 (50,0%) foram positivas para *Listeria* sp., sendo que, *L. monocytogenes* foi detectada em 32 amostras (18,0%); *L. innocua* em 30 amostras (16,9%); *L. seeligeri* em 40 (22,4%); *L. ivanovii* em 11 (6,2%); e *L. welshimeri* em 3% das amostras (1,7%).

Segundo Destro (2000), no Brasil em 1990 foi estudada a ocorrência da bactéria em 45 amostras de camarão congelado para exportação. Encontrou-se *L. innocua* do sorotipo 6a em

três amostras (6,6%) e a *L. monocytogenes* foi detectada em quatro amostras (8,8%). Entre os isolados de *L. monocytogenes* foram identificados os sorotipos 1a e 2a em três amostras e o 4b em uma amostra. Algumas amostras continham mais de uma espécie de listeria. Os sorotipos da *L. monocytogenes* encontrados foram 4b, 1/2a, 1/2b e 1/2c.

Laciar *et al.* (1998), reportaram a ocorrência de *Listeria* sp. em frutos do mar produzidos em São Luiz na Argentina. Das 50 amostras avaliadas, 28 eram em peixes e 22 em moluscos. Antonioli *et al.* (1998), relataram casos da bactéria em moluscos cozidos e crus em diferentes áreas da costa de Santa Catarina – Brasil. A epidemiologia de casos de listeriose nos EUA vem decrescendo substancialmente entre os anos de 1990 e 1993, tendo 7,7 casos para 4,2 casos por um milhão de pessoas (VOGEL, *et al.*, 2001).

Os moluscos crescem tipicamente em áreas costeiras em águas ricas em nutrientes e matéria orgânica. Entretanto, de acordo com a literatura, a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em mariscos e mexilhões é baixa e não há relatos sobre a presença de *Listeria monocytogenes* em ostras (WEAGANT *et al.*, 1988; MONTES, 1991; MASSUDA *et al.*, 1992).

1.7 Emprego Do Frio Em Alimentos

A faixa de crescimento de *L. monocytogenes* é de $-0,4^{\circ}\text{C}$ a 45°C , o que preocupa a indústria de alimentos, haja vista o crescente aumento de alimentos prontos, que devem ser mantidos por tempo consideráveis em temperatura de refrigeração (FRANCO & LAUDGRAF, 1996).

A utilização de baixas temperaturas para preservar os alimentos, baseia-se no fato das atividades metabólicas dos microrganismos podem ser minimizados e/ou detidas em temperaturas acima da temperatura de congelamento e geralmente inibidas em temperaturas baixo do congelamento. O fundamento desta afirmação baseia-se no fato de que todas as reações metabólicas dos microrganismos são catalisadas por enzimas, e que estas reações dependem da temperatura (JAY, 1992).

A natureza psicrófila da *Listeria* sp garante a sua sobrevivência e multiplicação durante o armazenamento sob refrigeração (Tabela 1). Doyle & Schoeni (1988), estudaram o crescimento de *Listeria* em vários produtos mantidos em temperatura de refrigeração e verificou que a bactéria crescia no leite, carnes, ovos e vegetais. *Listeria monocytogenes* é capaz também de crescer em peixes e frutos do mar (carne de caranguejo, camarão e lagosta

cozidos) armazenados a 4° e 5°C, podendo apresentar um crescimento de 2 a 3 logs em 1-2 semanas (BRACKETT & BEUCHAT, 1990, DORSA *et al.*, 1993).

Tabela 1: Resistência de *Listeria monocytogenes* à temperatura, nos diferentes alimentos. Valores: lagosta 5,0°C, Caranguejo azul 8,40°C em trypticase Ágar de soja, lagostim 5,5°C, mexilhão 4,25°C, salmão 5,6°C, bacalhau 5,7°C.

Temperaturas		D-Valor	Alimentos	Referências
(°C)	(°F)	(min)		
50	122	34,48	Blue crabmeat	HARRISON & HUANG, 1990
50	122	40,43	Blue crabmeat	HARRISON & HUANG, 1990
51,6	125	97,0	Lobster	BUDU-AMOAKO, <i>et al.</i> , 1992
54,4	130	55,0	Lobster	BUDU-AMOAKO, <i>et al.</i> , 1992
55	131	9,18	Blue crabmeat	HARRISON & HUANG, 1990
55	131	12,00	Blue crabmeat	HARRISON & HUANG, 1990
55	131	10,23	Crawfish tail meat	DORSA, <i>et al.</i> , 1993
56	132,8	48,09	Mussels, brine soaked	BREMER & OSBORNE, 1995b
57,2	135	8,3	Lobster	BUDU-AMOAKO <i>et al.</i> , 1992
58	136,4	16,25	Mussels, brine soaked	BREMER & OSBORNE, 1995b
58	136,4	10,73	Salmon	EMBAREK, 1995
58	136,4	7,28	Cod	EMBAREK, 1995
59	138,2	9,45	Mussels, brine soaked	BREMER & OSBORNE, 1995b
60	140	2,39	Lobster	BUDU-AMOAKO <i>et al.</i> , 1992
60	140	1,31	Blue crabmeat	HARRISON & HUANG, 1990
60	140	2,61	Blue crabmeat	HARRISON & HUANG, 1990
60	140	1,98	Crawfish tail meat	DORSA <i>et al.</i> , 1993
60	140	5,49	Mussels, brine soaked	BREMER & OSBORNE, 1995b
60	140	4,48	Salmon	EMBAREK, 1995
60	140	1,98	Cod	EMBAREK, 1995
62	143,6	1,85	Mussels, brine soaked	BREMER & OSBORNE, 1995b
62	143,6	2,07	Salmon	EMBAREK, 1995
62	143,6	0,87	Cod	EMBAREK, 1995
62,7	145	1,06	Lobster	BUDU-AMOAKO <i>et al.</i> , 1992
65	149	0,19	Crawfish tail meat	DORSA <i>et al.</i> , 1993
65	149	0,87	Salmon	EMBAREK, 1995
65	149	0,28	Cod	EMBAREK, 1995

68	154,4	0,15	Salmon	EMBAREK, 1995
68	154,4	0,15	Cod	EMBAREK, 1995
70	158	0,07	Salmon	EMBAREK, 1995
70	158	0,03	Cod	EMBAREK, 1995

1.8 Detecção e Identificação

1.8.1 Métodos Bacteriológicos

O ministério da agricultura nacional estabelece um método analítico para a detecção de *L. monocytogenes* em alimentos de origem animal. A metodologia aplica-se a todos os alimentos cárneos e lácteos. O enriquecimento seletivo é realizado em duas etapas a primeira em caldo UVM e a segunda em caldo Fraser. O efeito seletivo do caldo UVM é exercido pela associação de ácido nalidíxico e acriflavina e no caldo Fraser pelo cloreto de lítio, ácido nalidíxico e acriflavina. Nos produtos cárneos, a seleção se realiza em dois meios sólidos: ágar triptose com ácido nalidíxico (ATN) e ágar Palcam (AP), enquanto que nos produtos lácteos esta se realiza em ágar Oxford (AO), ágar Palcam e ágar triptose com ácido nalidíxico (ATN). O procedimento de preparo da amostra consiste em adicionar 25 +/- 0,2g ou ml em 225 ml de caldo UVM incubado a 30°C por 24hs. Após a incubação, transferir 0,1ml da cultura para um tubo contendo 10ml de caldo Fraser incubando a 30°C por 24 à 48hs. O isolamento ocorre quando repicamos do caldo Fraser para as placas ágar triptose com ácido nalidíxico (ATN) e placas contendo ágar Palcam (AP). Logo após devemos incubar as placas ATN a 30°C por 24hs e as placas AP na mesma temperatura por 24 à 48hs. A seleção das colônias se faz com o auxílio de um esterioscópio com iluminação angular de 45° onde se deve escolher colônias de cor azulada ou azul-acinzentada e ainda pode-se selecionar com o auxílio de um esterioscópio com iluminação normal onde se devem escolher as colônias pretas rodeadas por um halo escuro. A confirmação da presença de *Listeria* sp. é baseada na verificação das provas bioquímicas de produção de catalase, verificação das características morfológicas e tintoriais através da coloração de Gram, prova da motilidade típica, verificação da incapacidade de redução de nitrato e verificação da positividade nas reações de Vermelho de Metila e Voges Proskauer (VM-VP) (tabela 2). A diferenciação de *L. monocytogenes* das outras espécies realiza-se por meio da verificação da produção de beta-

hemólise em ágar sangue de cobaia ou ágar sangue de carneiro, verificação da capacidade de produzir reação de CAMP positiva com *Staphylococcus aureus* e opcionalmente também com *Rodococcus equi* e verificação da capacidade de fermentação dos carboidratos ramnose, xilose e manitol. A utilização concomitante de culturas de *R. equi* e *S. aureus* no CAMP teste é útil para a diferenciação de *L. ivanovii*, que apresenta reação de CAMP forte com *R. equi* em forma de flecha. Quando se julgar conveniente, a identificação poderá ser realizada por meio de um sistema comercialmente disponível de testes bioquímicos miniaturizados padronizados, conjuntamente com a prova de beta-hemólise ou CAMP teste (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1992).

Tabela 2 – Reações típicas das diversas espécies de *Listeria*. V=variável, AS=*S. aureus*, RE= *R. equi*, LM= *Listeria monocytogenes*, LIVA= *L. ivanovii*, LINN= *L. innocua*, LW= *L. welshimeri*, LS= *L. seeligeri*, LG= *L. grayi*.

	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. grayi</i>
Beta-hemólise	+	+	-	-	+	-
Redução de NO ₃	-	-	-	-	-	-
CAMP Teste-AS	+	-	-	-	+	-
CAMP Teste-RE	V	+	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	+
Ramnose	+	-	V	V	-	-
Xilose	-	+	-	+	+	-
Vermelho de Metila	+	+	+	+	+	+
Gram	+	+	+	+	+	+

Para a identificação da bactéria o método preconizado pela AOAC consiste em adicionar 25g de amostra em 225mL de meio seletivo líquido enriquecido com soja triptona e incubar a 30°C por 48h. Em seguida semear em meio seletivo sólido Oxford e incubar com a placa invertida a 30°C por 48h. A identificação presuntiva da *Listeria* as colônias devem apresentar-se pequenas, negras e com um halo negro ao seu redor. Logo após, deve-se repicar 5 colônias suspeitas em um meio TSYE e incubar a 37°C por 24h. Na interpretação dos resultados dos testes as *Listeria* sp, são Gram positivas, teste de CAMP positivo, motilidade positiva e catalase positiva. Para diferenciação entre as espécies deve-se levar em consideração uma combinação de resultados entre o teste da hemólise e o teste da utilização

dos carboidratos. Das 3 espécies de *Listeria* que fazem hemólise apenas a *L. monocytogenes* não é xilose com ramnose positiva (AOAC, 1995).

A USDA (U.S. Departamento de Agricultura), recomenda misturar por 2 minutos 25g de carne adicionado-o em pacote de stomacher contendo 225g de um caldo enriquecedor primário UVM (caldo da Universidade de Virmont). Logo após, a mistura é incubada a 30°C por 24h. Em seguida incuba-se a 35°C por 24 à 40h adicionando-se 0,1 mL do caldo de UVM em 10mL do caldo enriquecedor secundário de Fraser. Após a incubação secundária semeia-se em uma placa de ágar MX (modified Oxford medium) e incuba-se a 35°C por 24 à 40h e em seguida observam-se colônias suspeitas apresentando halos negros. A identificação de *L. monocytogenes* consiste em reconhecimento das colônias típicas de *Listeria* por verificação em microscópio de 45°, detecção de beta-hemólise incubando a 35°C por 16 à 24h em ágar HL, testes bioquímicos e teste de CAMP *S. aureus* positivo (APHA, 1992).

O API *Listeria* é um sistema padronizado para identificação das *Listerias* que utiliza mini-testes e uma base de dados. Trata-se de uma galeria que comporta 10 microtubos que contém os substratos desidratados e permitem a realização de testes enzimáticos ou fermentações de açúcares. As reações produzidas durante o período de incubação traduzem-se pelas mudanças de cor espontâneas ou reveladas pela adição de reagentes. A leitura destas reações é efetuada com o quadro de leitura e a identificação obtém-se consultando a lista dos padrões. O API *Listeria* não deve ser utilizado diretamente a partir das amostras de origem clínica ou outras. Os microrganismos devem ser isolados num meio de cultura adaptado segundo as técnicas habituais de bacteriologia. Na seleção das colônias deve-se verificar a estirpe/cepa a estudar pertence ao gênero *Listeria* que é um bacilo curto, Gram positivo, polimorfo móvel a 25°C, mas não a 37°C, catalase positiva e oxidase negativa. Para coletas que contém, freqüentemente, mistura de várias espécies de *Listeria*, é preferível efetuar uma sub-cultura em gelose de sangue a partir de uma colônia bem isolada. Incubar a placa 24 horas a 36°C +/- 2°C. Os meios seguintes podem ser utilizados para isolar as colônias antes da utilização da galeria API *Listeria*: meios gelosados de sangue não seletivos, em base Columbia ou TSA, com ou sem antibióticos e meio seletivos para *Listeria* com exceção do meio McBride que inibe a expressão enzimática das bactérias na galeria API *Listeria*. O sistema API destina-se à identificação das bactérias do gênero *Listeria* presente na base de dados. Não pode ser utilizado para identificar outros microrganismos ou excluir a sua presença. Devem apenas ser utilizadas culturas puras contendo um único tipo de microrganismo (API, 2003).

O FDA utiliza 25g de amostra homogeneizada em stomacher com 225mL do caldo enriquecedor BLED (caldo enriquecido buffered *Listeria*). Em seguida incuba-se por 4h a 0°C. Em seguida, adicionam-se os componentes seletivos ciclohexamida ou pimaricina na proporção de 25mg/L e incuba-se por 48h a 30°C. Após a incubação em meio enriquecido líquido, semear em meio sólido seletivo OXFORD, PALCAM, MOX ou LPM acrescidos de esculina e ferro e incubar a 30°C por 24 às 48h. Haverá o crescimento de colônias suspeitas de *Listeria* que deverão apresentar-se negras e com um halo negro ao seu redor. O próximo passo consiste em transferir aproximadamente 5 colônias suspeitas para o ágar TSAye (ágar soja tripticase) para caracterizar o isolamento das colônias típicas. Os procedimentos de identificação devem iniciar com a observação em microscópio com iluminação angular de 45°, verificação das características morfológicas em microscópio óptico com objetiva de imersão, teste da catalase, teste de Gram, testes de fermentação de carboidratos em tubos de TSBye (Caldo soja tripticase) ou em kits comerciais (MICRO-ID), teste de redução de nitrato, teste de motilidade e o CAMP teste (FDA, 1998).

8.2 Métodos Genéticos.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é a técnica que permite a amplificação do DNA ou C-DNA *in vitro*, utilizando-se basicamente de uma reação enzimática catalisada pela Taq DNA polimerase, enzima termoestável, cuja atividade depende de íons Mg^{++} , e ocorre em 3 etapas: desnaturação que consiste na separação da dupla fita do DNA a ser amplificado, anelamento ou hibridização; ligação do oligonucleotídeo iniciador ou *primer* ao DNA a ser amplificado e extensão que é a polimerização propriamente dita. Metodologicamente a técnica de PCR requer três passos (SAIKI, *et al.* 1988).

Marcadores moleculares são características do DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente. Os distintos tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade a nível de DNA, e assim, variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade. Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); SCAR (*Sequence*

Characterized Amplified Regions); STS (*Sequence Tagged Sites*); Microsatélite e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Baseado na técnica de PCR dois grupos independentes Williams, *et al*, (1990); Welsh & McClelland, (1990) desenvolveram quase que simultaneamente um sistema de amplificação de segmentos de DNA a partir de *primers* únicos, mais curtos e com sequência arbitrária de nucleotídeos. Esta técnica ficou popularizada como RAPD. O RAPD foi desenvolvido para o uso em mapeamento genético ou diagnóstico, utilizando a amplificação do DNA sem precisar do prévio conhecimento da sequência de nucleotídeos do genoma analisado. Na comparação de indivíduos através de RAPD, muitos produtos de amplificação resultantes podem ser idênticos entre si, havendo a possibilidade de amplificar segmentos únicos a um indivíduo. Este polimorfismo obtido é então utilizado como marcador molecular. O ensaio pode detectar uma única alteração no DNA genômico, uma vez que a mudança dos nucleotídeos induzida na região do *primer* produziu modificação no padrão de amplificação previamente determinado (WILLIAMS *et al*, 1990). O polimorfismo é utilizado para diferenciação de organismos e pode permitir a caracterização de isolados da mesma espécie (WELSH & McCLELLANS, 1990).

O princípio dos RAPDs está igualmente baseado na identificação de diferenças a nível de DNA. Entretanto a metodologia é totalmente diferente daquela dos RFLPs e se baseia na reação de polimerização em cadeia. Esta reação foi concebida em 1983 por Kary Mullis (Prêmio Nobel em 1993), publicada em 1985, mas utilizada de forma rotineira a partir de 1988 (SAIKI *et al.*, 1988). Esse método a amplificação de um fragmento de DNA, normalmente de até 4.000pb, mas em condições especiais de até 30 kb. Para amplificar, o *primer* utilizado é preciso anelar com sequências complementares e invertidas em relação às duas fitas que foram previamente separadas pelo aumento da temperatura (92-94°C). O anelamento entre os *primers* e as sequências complementares são efetuadas a uma temperatura de 35 a 50°C. A Taq DNA polimerase estende ou sintetiza as cadeias originadas pelos *primers*, cuja temperatura ótima de catálise é de 72°C.

Em muitas doenças, o defeito genético é desconhecido e a produção de sondas gene-específicas é muito difícil ou não é possível. Entretanto, o gene produtor da doença pode estar muito próximo ou ligado a um sítio de reconhecimento de uma enzima de restrição particular. Sabe-se que variações nas sequências de DNA ocorrem aleatoriamente por todo o genoma e não estão associados a uma doença específica. Estas variações, que são alterações de bases podem resultar nas perdas de sítios reconhecidos pelas enzimas de restrição existentes ou a aquisição de um novo sítio. Tais alterações nas sequências de DNA significam que os

fragmentos, produzidos por uma enzima de restrição particular, terão diferentes comprimentos entre diferentes indivíduos e podem ser reconhecidos por suas mobilidades em eletroforese. Eles são denominados polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP) e são herdados com as características genéticas simples obedecendo às leis mendelianas de herança. Se for demonstrado, em estudos de famílias, que um gene produtor de doença está ligado a um RFLP, este pode então, fornecer um meio de detectar o gene defeituoso sem efetivamente conhecê-lo (OLIVEIRA, 2004).

Os RFLPs mais informativos são aqueles cuja seqüência ocorre somente uma vez no genoma, denominados de cópia única. Desta forma, os RFLPs são específicos. Os RFLPs nucleares exibem codominância, ou seja, é possível distinguir os homozigotos entre si e estes do heterozigoto. Pleiotropia e epistasia que afetam a resolução dos marcadores morfológicos, não têm o menor efeito sobre os RFLPs. Devido a segura informação genotípica e ocorrência em grande número, estes marcadores possibilitam o desenvolvimento de mapas genéticos de ligação altamente saturados (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A PCR vem sendo empregado com êxito para detecção de vários microrganismos, destacando-se *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* sp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. em diferentes matrizes, como carnes e leite. A PCR permite a replicação *in vitro* de seqüências definidas de DNA, não sendo necessário, para isto, conhecer a estrutura completa do DNA alvo, mas apenas aquelas que flanqueiam a região a ser amplificada, definida por *primers* ou iniciadores, que hibridizam com estas regiões (MULLIS *et al.*, 1986).

Segundo Cohen *et al.*, (1994), devido ao fato da PCR detectar uma região única de um genoma bacteriano, a técnica demonstra maior especificidade quando comparada com os métodos microbiológicos tradicionais.

Em alguns experimentos com bactérias, destaca-se, a importância da especificidade e seletividade dos iniciadores utilizados. Ranh *et al.*, (1992), ao realizar seus ensaios, de 630 amostras de *Salmonelas* e 142 amostras de microrganismos não-salmonela, incluído 21 gêneros, verificaram amplificação em todas as amostras de DNA de *Salmonella*, exceto *S. litchfield* e *senftenberg*. A não amplificação nestes sorovares sugere a ausência de um gene *invA*. Devidos a isso estes microrganismos não seriam invasivos, ou possuiriam caminhos alternativos de penetração celular, com potencial patogênico ainda desconhecido.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolamento e identificação de *Listeria* sp. em amostras de pescado (peixes), ambiente de peixarias e indústrias de processamento (amostras ambientais e peixe inteiro) do litoral de Santa Catarina.

2.2 Objetivos Específicos

Isolar e identificar bioquimicamente *Listeria* sp. de amostras de pescado (peixes), ambiente de peixarias e ambiente de indústrias de pescado.

Detectar a *Listeria* sp nas amostras de pescado e ambiente através de marcador molecular utilizando a técnica de PCR.

Determinar a ocorrência de *Listeria* sp em amostras de pescado e ambientes de indústria do Litoral de Santa Catarina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Matéria Prima

A matéria prima constitui-se de pescados inteiros e “swabs” de amostras ambientais coletados de 8 estabelecimentos da indústria de processamento e peixarias do litoral de Santa Catarina compreendido entre os meses de março e novembro de 2003. Nestes locais foram coletadas amostras das bancadas de processamento, serra fita, parede, freezer, caixa de peixe, piso, ralo, expositor, câmara de resfriamento e da câmara de congelamento. Além disso, foram analisadas amostras de culturas de *L. monocytogenes*, sabidamente identificadas, oriundas de abatedouros de Londrina – PR (Tabela 3).

Tabela – 3 Origem das amostras colhidas para isolamento e identificação de *Listeria* sp. através de metodologia convencional e PCR.

Amostras	Método Convencional	PCR
Ambiente das indústrias de pescado	49	49
Pescado congelado	25	7
Ambiente de Abatedouros	11	11

O transporte das amostras até o laboratório foi realizado em recipientes térmicos com gelo e os “swabs” da indústria foram transportados em meio de transporte líquido (Letheen).

As 49 amostras ambientais foram coletadas seguindo a seguinte ordem:

1. **Estabelecimento 1:** 2 amostras da serra fita; 1 superfície do expositor; 1 do piso; 1 do ralo; 1 da bancada.
2. **Estabelecimento 2:** 1 amostra da serra fita; 1 câmara fria; 1 do piso; 1 do ralo; 1 da bancada; 1 câmara de congelamento.
3. **Estabelecimento 3:** 1 amostra da serra fita; 1 câmara fria; 1 do piso; 1 da bancada; 1 da bancada; 1 câmara de congelamento.
4. **Estabelecimento 4:** 1 amostra da serra fita; 1 câmara fria; 1 do piso; 1 da bancada; 1 da bancada; 1 câmara de congelamento.
5. **Estabelecimento 5:** 1 amostra da serra fita; 1 câmara fria; 1 do piso; 1 da mesa de manipulação; 1 da bancada; 1 câmara de congelamento.
6. **Estabelecimento 6:** 1 amostra da serra fita; 1 câmara fria; 1 do piso; 1 do ralo; 1 da bancada; 1 câmara de congelamento.

7. **Estabelecimento 7:** 1 amostra da serra fita; 1 câmara fria; 1 do piso; 1 do ralo; 1 da bancada; 1 câmara de congelamento.
8. **Estabelecimento 8:** 1 amostra da serra fita; 1 câmara fria; 1 do piso; 1 do ralo; 1 da bancada; 1 câmara de congelamento.

3.2 Detecção de *Listeria monocytogenes*

A bactéria foi isolada em amostras de pescado do litoral de Santa Catarina usando a determinação qualitativa em 25g de amostra homogeneizada em stomacher com 225mL do caldo enriquecedor BLED (caldo enriquecido buffered *Listeria*) (Figura 2 e 4). Incubou-se por 4h a 30°C. Em seguida, adicionaram-se os componentes seletivos cicloheximida ou pimarcina na proporção de 25mg/L e incubou-se por 48h a 30°C. Após a incubação em meio enriquecido líquido, o material foi semeado em meio sólido seletivo OXFORD e PALCAM acrescidos de esculina e ferro e deixado incubar a 30°C por 24 horas (Figura 5 e 6) (FDA, 1998).



Figura 2 – Preparo do caldo de enriquecimento para incubação da *L. monocytogenes* (foto do autor).

3.3 Procedimento de identificação de colônias

Foram utilizadas placas de TSA-YE, com o sistema de iluminação de Henry oblíquo, neste caso, colônias típicas aparecem como cinza-azulada ou azuis. O uso de controles conhecidos em TSA-YE é recomendado. Foram realizados testes de colônia típica para catalase uma vez que as espécies de *Listeria* são catalase-positivo. A coloração de Gram 16 para 24h, pois, todas *Listeria* sp. são pequenos, bastonetes Gram-positivos, porém, com culturas mais velhas a reação de coloração de Gram pode ser variável e células podem parecer na forma coccoidal. Depois disso, foi feito a inoculação das colônias provenientes do meio TSB-YE, no meio SIM por sete dias. As culturas foram incubadas à 22° C, visto que não apresentam motilidade a 37°C. A partir do meio de cultura TSB-YE, foram inoculados nas galerias do teste API que contem os substratos desidratados para realização de testes enzimáticos ou as fermentações dos açúcares: dextrose, esculina, maltose, rhamnose, manitol e xilose (figura 3) (FDA, 1998).

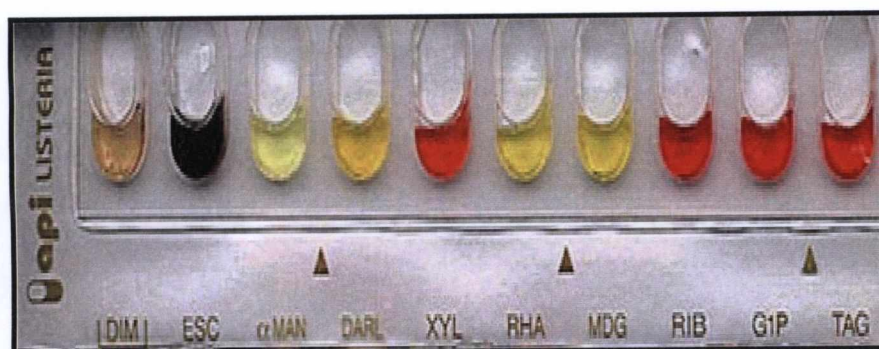


Figura 3 – Demonstração do teste do API – *Listeria* com a fermentação dos carboidratos inoculados com *Listeria monocytogenes* (foto do autor).

Figura 5 – Crescimento característico das colônias de *Listeria monocytogenes* em meio Palcam (foto do autor).

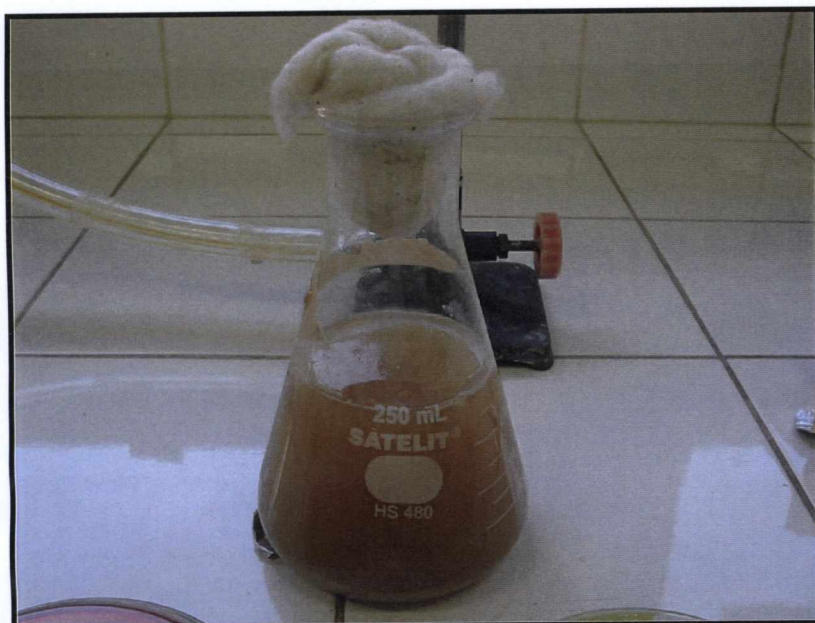


Figura 4 – Caldo de enriquecimento para *Listeria* sp incubado por 48h/30°C, após homogeneização com amostra de pescado (foto do autor).

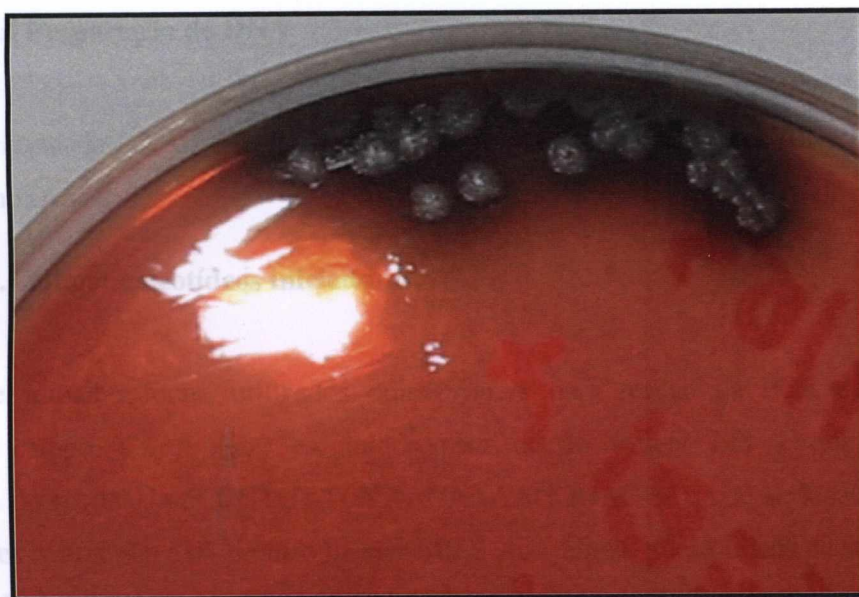


Figura 5 – Crescimento característico das colônias de *Listeria monocytogenes* em meio Palcam (foto do autor).

3.6 Amplificação e Eletroforese

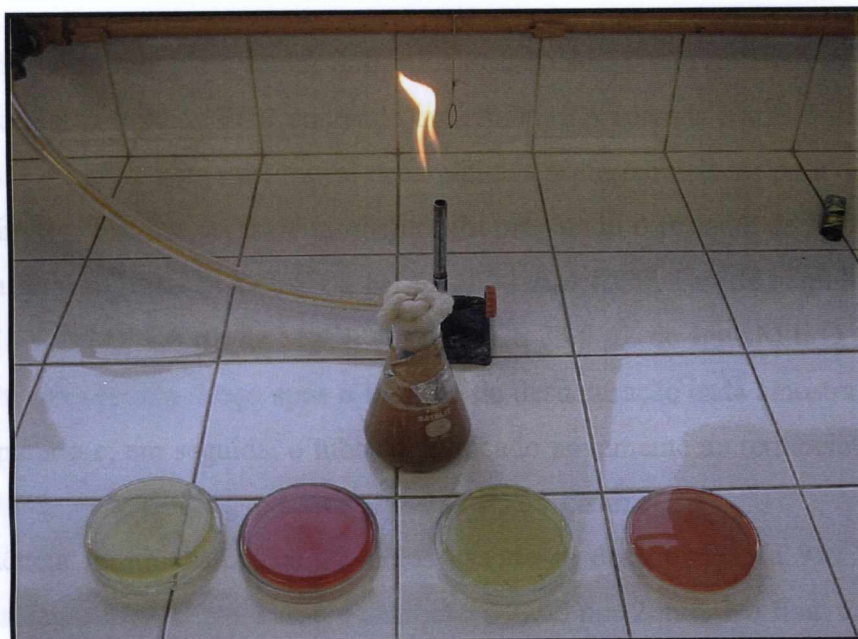


Figura 6 – Inoculação do meio de enriquecimento para o plaqueamento da amostra incubada em placas de ágar Oxford (verde) e Palcam (vermelho) (foto do autor).

3.4 Preparação do DNA

A extração do DNA foi realizada pelo método da sílica descrito por Alfieri (2000) que encontra-se no (Anexo 1).

3.5 Oligonucleotídeos iniciadores.

Neste trabalho foram utilizados dois *primers* para reação da PCR das amostras coletadas a campo. Os *primers* escolhidos para reação foram: LIS 1 que possui 20 nucleotídeos de sequência 5'-CCTGATGCAACAAAAGGGAC-3' e que se localiza entre os pares de bases (pb) 599 e 618, o outro *primer* LIS 2 que tem 20 nucleotídeos de sequência 5'-TGATAAAGTTGAGCAGCGGC – 3' que está localizado entre os pb 1224 e 1205. Estes *primers* amplificaram na amostra contendo *Listeria monocytogenes* um fragmento de 626 pb (MAKINO, *et al.*, 1995).

3.6 Amplificação e Eletroforese

Em um primeiro momento foram utilizados 8 μ L da suspensão do DNA extraído. Este foi então, transferido ao tubo de PCR contendo uma mistura preparada com 1,5 μ L (30 pmol) dos *primers* LIS 1 e LIS 2. Esta mistura foi encaminhada ao termociclador para desnaturação a 94°C por 3 minutos. Em um segundo momento, foi preparado o restante do MIX para PCR com 5 μ L de Buffer 10x (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 1 μ L de taqpolimerase 5U, 3 μ L de dNTP (100 mM), 1,5 μ L de MgCl₂ (1,5 mM) e 23,5 μ L de água Mili Q autoclavada para cada amostra processada. Logo após o término da desnaturação cada amostra recebeu 38 μ L do MIX preparado e, em seguida, o tubo foi colocado novamente no termociclador para o término da reação de PCR com o programa específico para *Listeria*.

Na sequência foram realizados 40 ciclos usando-se desnaturação a 94°C por 1 min seguido de anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 2 min. No final dos 39 ciclos ocorreu uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Para a eletroforese em gel utilizou-se gel de agarose 1,5% onde cada canaleta recebeu 7 μ L do produto e sua visualização com 5 μ g/ml de brometo por 1 hora e 30 minutos a 70 volts.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contaminação do pescado pode estar diretamente relacionada com a presença da bactéria na água de onde o peixe é capturado. A detecção de *Listeria* sp. em amostras de água de rios, de estações de tratamento de esgotos, em canais e lagos que desembocam no mar, sugere que sejam estas as fontes de contaminação das áreas costeiras do mar. No entanto, a contaminação do pescado pode iniciar nos porões de navios com poucas condições de higiene, em contato com o gelo produzido, com água não tratada, e durante o desembarque, onde a manipulação precária deste produto pode propiciar a ruptura da cavidade abdominal, facilitando a atividade enzimática e microbiana. Nas fábricas de processamento, a contaminação do pescado ocorre, principalmente, nas operações de evisceração e filetagem. Quando não há boas práticas de higiene, há o risco de se difundir a contaminação microbiana através do contato direto do manipulador com o pescado, na mistura do pescado já eviscerado com resíduos e na falta de limpeza e sanificação dos utensílios e equipamentos da indústria. A contaminação do pescado também pode ocorrer durante a comercialização, onde muitas vezes não é observada a manutenção da temperatura dos balcões refrigerados, além da manipulação e acondicionamento inadequados (KRETZSCHMAR, 1997).

No presente trabalho, amostras colhidas de peixarias e indústrias de processamento de pescado de Santa Catarina e de abatedouros do Paraná, foram avaliadas quanto à presença de *L. monocytogenes*. De um total de 74 amostras avaliadas, 49 (66,21%) eram do ambiente das indústrias, 25 (33,79%) amostras de peixes congelados das indústrias. Foram também analisadas 11 amostras oriundas de abatedouros de bovinos, sabidamente positivas para *L. monocytogenes* através de identificação bioquímica.

Através de isolamento e identificação bioquímica apenas 3 amostras, foram positivas para *Listeria* sp. representando 12% de ocorrência neste tipo de amostra e 4,1% de isolamento do total de amostras colhidas, sendo todas de pescado congelado (Figura 7).

Este resultado está em conformidade com a literatura, uma vez que em peixe fresco ou congelado a *Listeria* sp tem sido encontrada, com ocorrência variada (2 a 95%) (FABER & PETERKIN, 1991). Em um relato de Embarek & Huss (1994), a *Listeria* sp. foi radicalmente isolada de uma grande variedade de alimentos, incluindo peixes congelados defumados, camarões e peixes fermentados. As três (12%) amostras de peixe congelado apresentaram crescimento de colônias suspeitas para *Listeria* sp no ágar Palcam e Oxford, sendo, uma (4%) cepa identificada como *L. innocua* e duas (8%) como *L. monocytogenes*, ambas identificadas no teste API Listeria.

Adesiyum (1993) estudou a prevalência de *Listeria* sp. em amostras de alimentos vendidos na cidade de Trinidad. Das 61 amostras de peixes examinadas 9 (14,8%) foram positivas para *Listeria* sp. e das 41 amostras de camarões examinadas apenas 2 (4,9%) foram positivas para este organismo. Neste total de 102 amostras, somente 2 (2,0%) amostras foram positivas para *L. monocytogenes*. No presente trabalho, a ocorrência da bactéria foi significativamente menor.

O número baixo de amostras identificadas bioquimicamente neste trabalho pode ser justificado de acordo com um trabalho realizado por Faber & Peterkin (1991), onde o aparente sucesso de peixe cru propiciar o crescimento de *Listeria* sp a baixas temperaturas pode ser atribuído pela competição com os microrganismos nativos, geralmente presentes em grandes quantidades neste tipo de alimento. Um exemplo disso foi um trabalho realizado por Lovett (1990), que avaliou o crescimento de *L. monocytogenes* em camarão, carne de caranguejo, sumi e peixe previamente esterilizados. De um inóculo inicial de aproximadamente 10^3 C/g, o número de *L. monocytogenes* aumentou 3 e 5 logs após o armazenamento a 7°C por 2 semanas, respectivamente.

Em um trabalho realizado por Petran & Swanson (1993), foi relatado que caldos de enriquecimento comumente utilizados na obtenção de *Listeria* favorecem o crescimento de *L. innocua* em relação a *L. monocytogenes*. Quando estas bactérias foram inoculadas em caldos de enriquecimento tais como: TSB-YE, FRASER e UVM, o tempo de geração de *L. innocua* foi mais rápido do que o da *L. monocytogenes*, além disso, a população de *L. innocua* foi maior. Desta forma, é possível que a real incidência de *L. monocytogenes* não seja formalmente registrada, uma vez que os meios de enriquecimento usados no isolamento de *Listeria*, parecem favorecer a multiplicação de *L. innocua* (CURIALE & LEWS, 1994).

Métodos convencionais para detecção e identificação de *L. monocytogenes* são laboriosos, requerem muito tempo e não são sensíveis (KLEIN & JUJENA, 1997). Além de consumir um grande tempo (aproximadamente 6 dias para obter o resultado final), estes testes

podem dar resultados variados, pois são baseados em características fenotípicas da *Listeria*. Recentemente, foi demonstrado que a identificação bioquímica de *Listeria* nem sempre é exata e que testes genéticos tendem a induzir para reclassificação de vários isolados (AZNAR & ALARCON, 2002).

O fato de várias espécies de *Listeria* serem semelhantes em termos morfológicos, bioquímicos e genéticos, a efetiva prevenção e o controle da listeriose humana depende da viabilidade, rapidez e da especificidade dos testes para detecção e diferenciação da *L. monocytogenes* das outras espécies de *Listeria*. Por muitos anos os diagnósticos laboratoriais de listeriose foram realizados por métodos convencionais de cultura *in vitro*, seguidos de testes sorológicos e bioquímicos. Estes testes são lentos, variáveis e algumas vezes levam a erros, entretanto eles são importantes, pois contribuíram para a redução da incidência da listeriose humana no passado (AZNAR & ALARCON, 2002). Visando complementar a eventual falha na identificação de *Listeria*, este trabalho não só faz o isolamento tradicional mas também a PCR.

Em um trabalho realizado por Pelisser (1998), a sensibilidade do método que utilizava ágar Palcam foi de 67% devido a presença de 7 resultados falso-negativos. Um fator que talvez tenha influenciado este resultado foi à presença de outras bactérias no produto, que poderia ter inibido as cepas de *Listeria* sp, dificultando seu isolamento. Neste trabalho não se observou resultado falso-positivo, sendo, portanto, 100% específico.

Com relação ao teste bioquímico API Listeria, este apresenta a vantagem, em relação aos testes bioquímicos convencionais, pelo fato de possuir o teste DIM (presença de arylamidase) que diferencia *L. innocua* de *L. monocytogenes*, não havendo necessidade de realizar os testes de beta-hemólise e camp-teste (BEUMER *et al.*, 1996).

Em seu trabalho Bille *et al.* (1992), descreveram que entre as 646 amostras de *Listeria*, 548 amostras (88,4%) foram corretamente identificadas a partir do sistema API. Sendo que 97,7% das amostras de *L. monocytogenes* e 99,4% das amostras de *L. innocua* foram identificadas com o sistema.

Rotineiramente, os métodos utilizados para detecção de *Listeria* sp em alimentos, requerem a utilização de meios de cultura seletivos e enriquecidos (FABER & PETERKIN, 1991; SEELIGER & JONES, 1986), consumindo tempo e trabalho. Desta maneira, a detecção rápida e confiante para *L. monocytogenes* é desejável. Para isto a detecção baseada na PCR é altamente específica, sensível e elimina a necessidade de utilização de meios de cultura enriquecidos (LANTZ, *et al.*, 1994; MAKINO, *et al.*, 1993). Atualmente novos métodos têm sido introduzidos, especialmente os baseados em genes, e certamente, a melhoria dos métodos

microbiológicos tradicionais. Há ainda a real necessidade para a adaptação dos métodos de detecção para a indústria de processamento (BURBERT, *et al.*, 1994).

Das 67 amostras analisadas neste trabalho através de PCR, sendo 49 do ambiente das indústrias de pescado, 7 de pescado congelado e 11 de ambiente de abatedouros, 11 (16,41%) foram positivas para *Listeria* sp. sendo, 5 (10,2%) detectadas no ambiente: 1 (2,04%) da superfície do expositor (estabelecimento 1), 1 (2,04%) do ralo (estabelecimento 1), 1 (2,04%) da bancada (estabelecimento 3), 1 (2,04%) da câmara de congelamento (estabelecimento 4), 1 (2,04%) da superfície da mesa de manipulação (estabelecimento 5); 1 (14,7%) de peixe congelado (estabelecimento 7) e 5 (45,5%) amostras de abatedouros de bovinos (Figura 7).

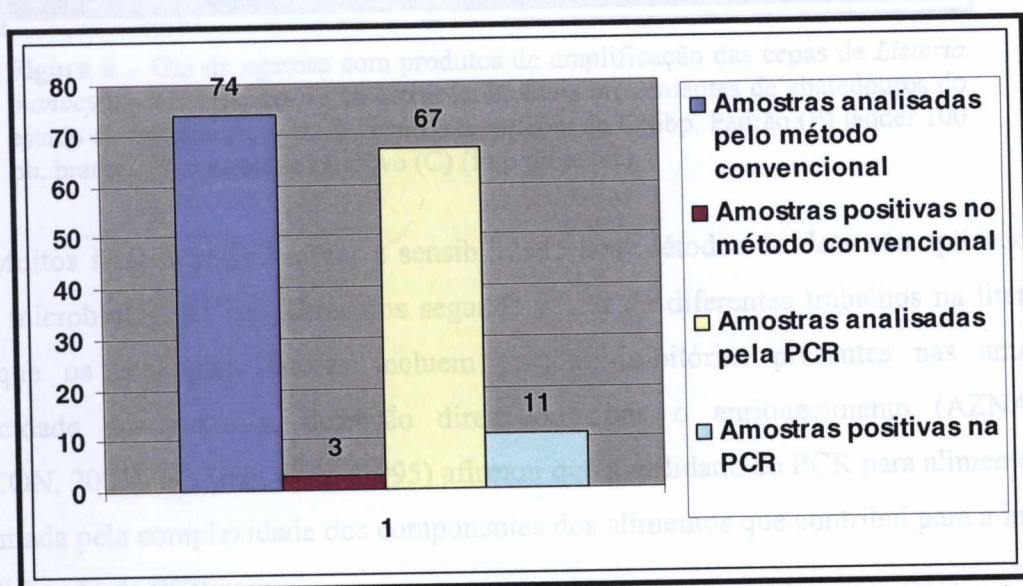


Figura 7 – Resultado das análises obtidas nos dois métodos utilizados convencional e PCR.

Na figura 8, observamos que entre as 11 amostras de abatedouro analisadas, 5 amostras (45,5%) apresentaram reação positiva para a PCR e 6 amostras (54,5%) não apresentaram amplificação. Todas as amostras foram testadas e confirmadas para *L. monocytogenes* nos teste bioquímicos. Além disso, as 3 amostras positivas em pescado pelos métodos de isolamento convencionais, também não apresentaram amplificação na PCR.

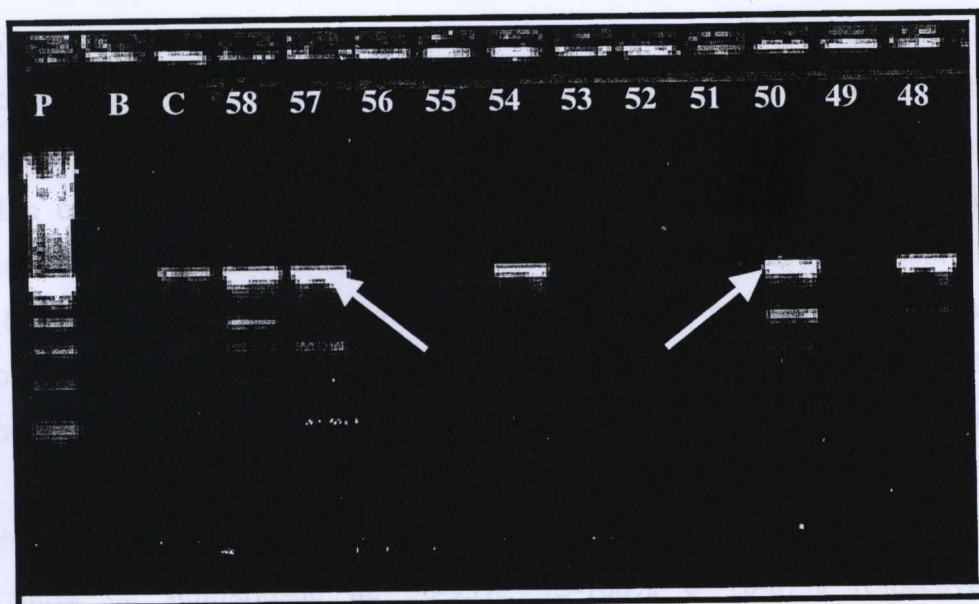


Figura 8 – Gel de agarose com produtos de amplificação das cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de amostras ambientais provenientes de abatedouros do estado do Paraná. As setas indicam o amplicom de 626bp. Padrão (P) ladder 100 pb, branco (B) e controle positivo (C) (foto do autor).

Muitos fatores podem afetar a sensibilidade dos métodos de detecção aplicados nas análises microbiológicas nos alimentos segundo relato de diferentes trabalhos na literatura, sendo que os principais fatores incluem reações inibitórias presentes nas amostras, especificidade dos *primers*, detecção direta ou após o enriquecimento (AZNAR & ALARCON, 2003). Makino, *et al.* (1995) afirmou que a utilidade do PCR para alimentos tem sido limitada pela complexidade dos componentes dos alimentos que contribui para a inibição da amplificação da PCR.

A presença de inibidores não parece ser a explicação mais provável uma vez que a amplificação das cepas provenientes de abatedouros e pescado forma realizadas após o isolamento bacteriano e não diretamente do alimento. Sendo assim, uma explicação mais provável para as falhas de reação observadas é de que as diferenças no genótipo existentes no DNA das bactérias podem acarretar em inibição da PCR.

Os *primers* LIS 1 e LIS 2 utilizados para reação da PCR, foram testados em várias cepas de *Listeria* como: *L. monocytogenes* sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4^a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 5, 6 e 7; *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovi* e *L. murrayi* apresentando amplificação para todos com exceção das espécies *L. selligeri* e *L. grayi* (MAKINO *et al.*, 1995).

Entretanto, vários trabalhos de ribotipagem e pulsed-field gel eletroforese (PFGE) demonstraram a diversidade entre as cepas de *Listeria*. Lozniewski, *et al* (2001), realizou um

trabalho onde foram analisadas 32 amostras de *L. monocytogenes*, ele constatou diferenças no genótipo entre os mesmos sorotipos, quando o DNA era submetido a digestão pelas enzimas *Sma*I e *Apa*I na análise por PFGE.

Em outro trabalho demonstrando a variabilidade gênica das espécies de *Listeria* Lukinmaa, *et al* (2004), descreveu que o índice discriminatório (ID) dado pela ribotipagem (ID= 0,873) é mais baixo do que o da PFGE (ID= 0,946) quando utilizavam as enzimas *Eco*RI ou *Pou*II para ribotipagem e *Apa*I ou *Sma*I para PFGE. Entretanto as duas são maiores que o método convencional de sorotipagem (ID= 0,562). Neste trabalho o autor constatou que apenas 1 ribotipo pertence a várias categorias de PFGE, por exemplo a RT- 1 tem 11 categorias de PFGE, RT -2 tinha 7 categorias de PFGE e RT -4 tinha 4 categorias de PFGE, com valores de similaridade de 50-93%, 75-100% e 70-87% respectivamente. O polimorfismo detectado pelo PFGE é atribuído pelas alterações do DNA tais como: mutações, deleções ou inserções captadas pelas enzimas de restrição (TENOVER, 1995).

Em contraste com os testes de diagnóstico convencionais, os testes de PCR não consomem apenas menos tempo, mas eles também são menos influenciados por fatores externos que alteram o crescimento e o metabolismo das bactérias (BATT, 1997).

Com tudo, o resultado positivo na PCR não certifica a presença de *Listeria* sp. viável na amostra. A figura 9 mostra um produto de amplificação para *Listeria* sp. à partir de uma amostra ambiental. Esta foi coletada da mesa de manipulação apresentando amplificação do fragmento 626 pb característico para os *primers* utilizados. Entretanto, esta amostra não apresentou crescimento nos ágaros Palcam e Oxford.

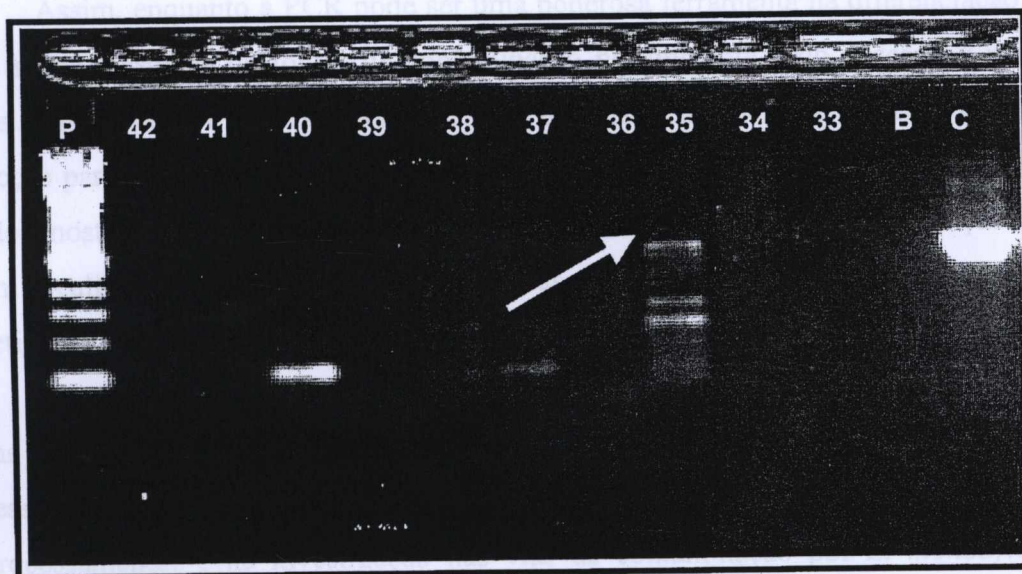


Figura – 9 Amostra de ambiente positiva para *Listeria sp* detectada através da PCR. A seta indica o produto característico amplificado com 626 bp, (P) ladder 100bp, (B) branco e (C) controle positivo *Listeria monocytogenes* (foto do autor).

Considerando as amostras de pescado, uma amostra positiva através de PCR também não apresentou resultado positivo através do enriquecimento e isolamento pelos métodos tradicionais.

Desde a introdução por Kary Mullis em 1993, a tecnologia de reação em cadeia da polimerase tem se provado um valioso método para detecção de patógenos em alimentos. Entretanto, as técnicas convencionais de PCR podem detectar tanto as células vivas como as mortas (CUDJOE *et al*, 1997). Ainda a técnica não diferencia cepas de diferentes origens e possibilita o aparecimento de falsos positivos devido a amplificação de DNA de células mortas. Contudo, trabalhos recentes tem tentado contornar este problema utilizando a amplificação após transcrição reversa (RT-PCR) de RNA mensageiro (RNAm) (ALMEIDA, 2000).

Outra explicação para este fenômeno é de que bactérias encontradas no ambiente estão submetidas a fatores de estresse que impediriam seu isolamento pelas técnicas de cultura, enquanto que seu genoma poderia ser detectado pela PCR (MÜLLER *et al.*, 2000).

A sensibilidade dos *primers* também influencia no limite de detecção. Em um trabalho realizado por Ericsson (1997), foi detectado *Listeria monocytogenes* em truta arco-íris em diferentes UFC/g de truta. Amostras que continham de 0-10 UFC/g não foram detectadas pela reação da PCR. Entretanto, nas amostras que continham de 100-10.000 UFC apresentaram reação positiva para a PCR.

Assim, enquanto a PCR pode ser uma poderosa ferramenta na diferenciação de cepas de *Listeria*, pesquisa de fontes de contaminação no ambiente e do pescado e pesquisa de cepas estressadas por fatores ambientais, não pode isoladamente ser utilizado como teste de detecção para fins de controle de qualidade do alimento. Neste trabalho detectou-se *Listeria* sp. de amostras de pescado e do ambiente. Sugere-se que análise de caracterização molecular sejam realizadas para determinação se as amostras encontradas no pescado são geneticamente semelhantes às encontradas no ambiente.

Rörvik *et al*, (1995) constatou que havia contaminação por *L. monocytogenes* em trutas e que provavelmente esta se deve ao local de processamento. Há por tanto a necessidade de verificar os produtos quanto à presença de *L. monocytogenes* antes de ocorrer o processamento. Uma investigação nas vias de contaminação por *L. monocytogenes* em produtos em uma indústria de processamento de salmão defumado, observou-se o aparecimento de um clone de *L. monocytogenes* colonizando o ambiente de processamento durante um período de 8 meses de amostragem e contaminando o salmão defumado durante o processamento. As origens da bactéria nas indústrias de defumação não foram identificadas, mas o peixe cru, não seria a fonte (RÖRVIK *et al*. 2000).

O emprego do frio nos alimentos não torna o perigo de contaminação com *L. monocytogenes* menos eminente, uma vez que a presença desta bactéria em pescado e no ambiente da indústria indica que condições favoráveis a sua veiculação e permanência estão presentes. Assim, o conhecimento das rotas de contaminação bem como dos fatores biológicos e ambientais que favorecem a permanência da *Listeria* sp. no ambiente das indústrias de alimento é necessário para a adoção de Boas Práticas de Fabricação e Boas Práticas de Higiene Operacional adequadas juntamente com a implantação do Sistema HACCP que atuem na prevenção da contaminação dos alimentos pela *L. monocytogenes*.

6. CONCLUSÃO

- Foi possível de detectar por PCR a presença de células de *L. monocytogenes* ambientais após o seu enriquecimento e diretamente de amostra de pescado congelado.
- *Listeria* sp. foi encontrada em 10,2% das amostras colhidas do ambiente das indústrias de pescado, através da PCR.
- A detecção por PCR foi mais efetiva do que o meio convencional na detecção de *Listeria* sp de amostras ambientais utilizadas neste trabalho. Sendo, portanto, recomendada a sua utilização nas plantas de processamento para o monitoramento da contaminação dos alimentos.
- Cepas de *Listeria* sp. isoladas pelas técnicas convencionais não apresentaram produto de amplificação, sugerindo variabilidade genética entre as cepas isoladas.
- Foi encontrada ocorrência de 12% de *Listeria* sp em amostras de pescado congelado através de isolamento e identificação bioquímica.
- Em 4% de amostras de pescado congelado encontrou-se *L. innocua*.
- *Listeria monocytogenes* foi encontrada em 8% do total de amostras de pescado congelado analisadas.

REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N., SZYFRES, B. **Zoonoses y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales**. 2 ed. Washington: Organización panamericana de la salud. 1997. p. 269.
- ADESYUN, A. A. Prevalence of *Listeria* sp., *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp., *Yersinia* sp. and toxigenic *Escherichia coli* on meat and seafoods in Trinidad. **Food Microbiology**. v. 10, p.395-403, 1993.
- ALFIERI, A. F. **Caracterização dos genótipos G e P de Rotavirus grupo A de origem animal (bovina e suína) e de origem humana pela Reação da Polimerase em Cadeia**. 1999. 134 p. Teses (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP, São Paulo.
- ALMEIDA, P. F., ALMEIDA, R. C. C. A PCR protocol using *inl* gene as a target for specific detection of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**. V.11. p.97-101. 2000.
- ANTONIOLLI, M. A., MENDES, S.M.C., BONELLI, R. R., JORDANI, E., BATISTA, C. R. V. Influência de diferentes tempos de cozimento sobre a população bacteriana de mexilhão *Perna perna* cultivado no litoral de Santa Catarina. In: **V CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS**. Lindóia, SP. 22-26 November 1998 Livros de resumos. P. Q. 28.1, p. 119.
- AOAC, 1994. **Listeria monocytogenes in dairy products, seafoods, and meats: Identification assay method for *Listeria monocytogenes***. Sec. 17.10.05, Method 994.03. In Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed., P.A. Cunniff (Ed.), p. 106-106b. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- APHA. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association. 1992. 3 edição. p. 637-658.

API LISTERIA. Manual Técnico de Aplicação. Método de identificação bioquímica de *Listeria monocytogenes*. p. 1-6. 2003.

AZNAR, R., ALARCON, B. On the specificity of PCR detection of *L. monocytogenes* in food: a comparison of published *primers*. **System Applied Microbiology**. n. 25. p.109-119. 2002.

AZNAR, R., ALARCÓN, B. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. **Journal Applied Microbiology**. v. 11. p. 958-966. 2003

BATT, C. A. Molecular diagnostic for dairy-borne pathogens. **Journal Dairy Science**. n. 80. p. 220 – 229. 1997.

BEAN, N. H., GRIFFIN, P. M. Foodborne disease outbreaks in the USA, 1973 – 1987 pathogens, vehicles and trends. **Journal of Food Protection**, v. 53. n.9. p.804 – 817. 1990.

BERSOT, L. A importância de *Listeria monocytogenes* para a saúde pública. In: **I CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPECIALIDADES EM MEDICINA VETERINÁRIA**. Curitiba. Anais. 2002. p.1-4.

BEUMER, R. R., GIFFEL, M. C., KOK, M. T. C. Confirmation and identification of *Listeria* sp. **Letters in applied microbiology**. v. 22. p.448-452. 1996.

BILLE, J., CATIMEL, B., BANNERMAN, E., JACQUET, C., YERSIN, M. N., CANIAUX, I., MONGET, D., ROCOURT, J. API Listeria, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. **Applied and Environment Mycrobiology**. vol. 1. p. 366. 1992.

BRACKETT, R. E., BEUCHAT, L. R. Patogenicity of *Listeria monocytogenes* grown on crabmet. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 12, p.1216-1220, 1990.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA. Brasil. Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos. 1992.

BREMER, P. J., OSBORNE, C. M. Efficacy of Marinades against *Listeria monocytogenes* Cells in Suspension or Associated with Green Shell Mussels. **Applied and Environmental Microbiology**. Nova Zelândia, 27 jan. v. 61. n. 4. p.1514-1519. 1995a.

BREMER P. J., OSBORNE, C. M. Thermal-death times for *Listeria monocytogenes* in green shell mussels (*Perna canaliculus*) prepared for hot smoking. **Journal Food Protect.** n. 58 p.604-608. 1995b.

BUDU-AMOAKO, E., TOORA, S., WALTON, C., ABLETT, R.F., SMITH, J. Thermal death times for *Listeria monocytogenes* in lobster meat. **Journal Food Protect.** n. 55. p. 211-213. 1992.

BURBERT, A., SCHUBERT, P., KÖHLER, S., FRANK., GOEBEL, W. Synthetic peptides derived from *L. monocytogenes* p60 protein as antigens for the generation of polyclonal antibodies specific for secreted cell-free *L. monocytogenes* p60 proteins. **Applied Environmental Microbiology**. v. 60, p.3120-3127, 1994.

COLBURN, K. G., KAYSNER, C. A., ABEYTA, C. Jr., WEKEL, M., M. *Listeria* sp in a California coast estuarine environment. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 56, p. 2007-2011, 1990.

COHEN, N. D.; McGRUDER, E. D.; NEIBERG, H. L.; BEHLE, R. W.; WALLIS, D. E.; HARGIS, B. M. 1994. Detection of *Salmonella enteritidis* in feces from poultry using booster polymerase chain reaction and oligonucleotide primers specific for all members of the Genus *Salmonella*. **Poultry Science**, v. 73, p.354-357.

CONNER, D. E., BRACKETT, R. E., BEUCHAT, L. R. Effect of temperature, sodium chloride, and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p.2007-2011. 1990.

CUDJOE, K. S. PATEL , P. D., OLSEN, E., SKJERVE, E., OLSVIK, O. Immunomagnetic separation techniques for the detection of pathogenic bacteria in foods. IN: R. G. KROLL, A. GILMOUR, M. SUSSMAN (EDS.), **new techniques in food and beverage microbiology**. London, UK: Blackwell Scientific Publications.1997. p. 17-29.

- CURIALE M. S., LEWS, C. Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *L. innocua*. **Journal of Food Protection**. v. 57, p.1048-1951, 1994.
- DESEO, J. *Listeria monocytogenes* in processed meats. **AOAC International**, Arlington, v.3, n.4, p.23-24, 1999.
- DESTRO, M. T., PIVA, F. C., LEITÃO, M. F. F., LANDGRAF, M. 1994. Occurrence of *Listeria sp.* in shrimp from Brazilian processing plant. IN: 3RD INTERNATIONAL ASEPT CONFERENCE, FOOD SAFETY 94. 1994. p.330.
- DESTRO, M.T. Incidence and significance of *Listeria* in fish and fish products from Latin America. **Internacional Journal of Food Microbiology**. v.62. p.191-196, 2000.
- DIJKSTRA, R. G. The occurrence of *L. monocytogenes* in surface water of canals and lakes, in ditches of on big polder and in the effluents and canals of a sewage treatment plant. **Zbl Bakt Hyg.** v. 176, p.202-205, 1982.
- DOYLE, M. P., SCOENI, J. L. Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. **Food Tecnology** v. 42, n.4, p.169-171, 1988.
- DORSA, W. J., MARCHAL, D. L., MOODY, M. W., HACKNEY, C. R. Low temperature growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in precooked crawfish tail meat. **Journal of Food Protection**, v. 56, p.106-109. 1993.
- EMBAREK, P. K, HUSS, H. H. Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: review. **International Journal of Food Microbiology**. v. 23 p. 17-34. 1994.
- EMBAREK, P. K. B., HUSS, H. H. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in vacuum packaged pasteurized fish fillets. **Intl. Journal Food Microbiology**. n. 20. p.85-95. 1993
- EMBAREK, P. K. B. Efficacy of Marinades against *Listeria monocytogenes* Cells in Suspension or Associated with Green Shell Mussels. **Applied and Environmental Microbiology**. Nova Zelândia, 27 jan. v. 61. n. 4. p.1514-1519. 1995.

ERICSSON, H., STALHANDSKE, P. PCR detection of *Listeria monocytogenes* in 'gravad' rainbow trout. **Journal of Food Microbiology**. n. 35. p.281-285. 1997.

FABER, J. M. PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiology**. Rev. 55. p. 476–511. 1991.

FAO. **Report of the FAO expert consultation on the trade impact of *Listeria* in fish products**. Rome: FAO, 1999. 34p. (FAO Fisheries Report., n.604).

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **BAM - Bacteriological Analytical Manual**. 8th ed. Revision A. AOAC International. 1998.

FERMAM, R. K. S. HACCP e as Barreiras Técnicas. **Inmetro**. São Paulo, março de 2004. Disponível em: < <http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas>>. Acesso em: 8 de março, 2004.

FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília, **Embrapa**. P. 220. 1998.

FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: ateneu, p.34. 1996.

FUCHS, R. S., SIRVAS, S. Incidence of *Listeria monocytogenes* in an acidified fish product, ceviche. **Letters in Applied Microbiology**, n. 12, p.88-90, 1991.

GERMANO, P. M. L., OLIVEIRA, J. C. F., GERMANO, M. I. S. O pescado como fonte de toxinfecção bacteriana. **Higiene Alimentar**, v. 7, n. 28, p.40-45, 1993.

HARRISON M. A., HUANG, Y. 1990. Thermal death times for *Listeria monocytogenes* (Scott A) in crabmeat. **Journal Food Protect**. n. 53 p.878-880. 1990.

HOFER, C. B., MELLES, C. E. A, HOFER, E. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. v.41.n.6, 1999.

HUSS, H. H., REILLY, A., BEM EMBAREK, P. K. Prevention and control of safety hazards in cold smoked salmon production. **Food control**. n.11. p.149-156. 1999.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 3rd ed. Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1992.

KLEIN, P. G., JUNEJA, V. K. Sensitive detection of viable *L. monocytogenes* by reverse transcription-PCR. **Applied Environmental microbiology**. n.63, p.4441-4448. 1997.

KRETZSCHMAR, M. **Estudo comparativo de metodologia para avaliar a recuperação e sobrevivência de *Listeria* sp, frente à microbiota residente de pescado mantido em temperatura de refrigeração e congelamento**. 1997. Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. p.156.

LACIAR, A. L., VACA, L., CENTOBI, O. N. P. Aislamento de *Listeria* sp. em produtos de pescaderia. IN: **VIII CONGRESSO ARGENTINO DE MICROBIOLOGIA. ASSOCIACIÓN ARGENTINA DE MICROBIOLOGIA**. Buenos Aires, Argentina, 6-9 September 1998. p. 324.

LANTZ, P. G. F., TJERNELD, E., BORCH, B., HAHN-HUA GERDAL, P., RÅDSTRO“M. Enhanced sensitivity in PCR detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese through use of an aqueous two-phase system as a sample preparation method. **Applied Environment Microbiology**. V. 60 p.3416–3418. 1994.

LORBER, B. *Listeria monocytogenes*. In: MANDELL, DOUGLAS & BENNETT'S. **Principles and Practice of Infectoris Diseases**. 15 ed. Philadelphia: Ed. Churchill Livingstone, p. 2208-2212, 2000.

LOU, Y., YOUSEF, A. E. Adaptation to Sublethal Environmental Stress Protects *Listeria monocytogenes* against Lethal Preservation Factors. **Applied and Environmental Microbiology**.v.63.n.4. p.1252-1255, 1997.

LOVETT, J. *Listeria* isolation. In: UNITED STATES. DEPARTMENT OF HEALTH EDUCATION AND WELFARE, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual**. Washington. v. 9. 1990.

LOZNIEWSKI, A., HUMBERT, A., CORSARO, D., SCHAWARTZBROD, J., WEBER, M., LE FAOU, A. Comparison of sludge and clinical isolates of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 32. p. 336-339. 2001.

LUKINMAA, S., AARNISALO, K., SUHKO, M. L., SIITONEN, A. Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates of human and food origin studied by serotyping, automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **National Public Health Institute**. 2004.

MASSUDA, T., IWAYA, M., MIURA, H., KOKUBO, Y., MARUYAMA, T. Occurrence of *Listeria* species in fresh seafood. **Journal of Food Hyg Soc Japan**, 33, p.599-602. 1992.

MAKINO, S.-I., IINUMA-OKADA, Y., MARUYAMA, T., EZAKI, T., SASAKAWA, C., YOSHIKAWA, Y. Direct detection of *Bacillus anthracis* DNA in animals by polymerase chain reaction. **Journal Clinical Microbiology**. n. 31. p.547-555. 1993.

MAKINO, S.-I., OKADA, Y., MARUYAMA, T. A new method for direct detection of *Listeria monocytogenes* from foods by PCR. **Applied and Environment Microbiology**. n. 27. p.3745-3747. 1995.

MONTES, M. L. Jr. Incidence of *Listeria* in shrimp, oysters, and estuarine waters. **Journal of Food Protection**, 54, n2, p.170-173. 1991.

MURIANA, P. M. Bacteriocins for control of *Listeria* sp. In food. **Journal Food Protection**, v. 59, p.54-63, 1996.

MÜLLER, A. J., BAYLES, D. O., EBLEN, B. S. Cold Shock Induction of Thermal Sensitivity in *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environment Microbiology**. n. 10. v. 66. p. 4345-4350. 2000.

MULLIS, K.; B.; FALLONA, F.; SCHARF, S. J.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. New York, v. 51, p. 263-273.

NICHELSON II, R., FINE, G. Fishs, Crustaceans and precooked seafoods. IN: **COMPEDIUM OF METHODOS FOR THE MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF FOODS**. Washington. APHA. 1992. p.1219-1230.

OLIVEIRA, C. J. R. Aplicações Teóricas da Biologia Molecular/Engenharia Genética em Análises Clínicas. **Universidade Metodista**. Disponível em: <<http://www.entreaqui.net/sigcell/pdf/engenhariagenetica.pdf>>. Acesso em: 8 de março, 2004.

OGAWA, M. **Manual de pesca ciência e tecnologia do pescado**. São Paulo:1999. 140 p. Bibliografia: p. 139-141. ISBN 85-85519-44-4.

PELISSER, M. R. **Deteccão de *Listeria* sp em frangos resfriados comercializados em Florianópolis – SC, através do método rápido de ClearewTM e método convencional**. Florianópolis, 1998. 66p. Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina.

PETTRAN, R. L., SWANSON, K. M. J. Simultaneous growth of *L. monocytogenes* and *L. innocua*. **Journal of Food Protection**. v. 56, n. 7. p.616-618. 1993.

RAHN, K.; DE GRANDIS, S. A.; CLARKE, R. C.; McEWE, S. A.; GALÁN, J. E.; GINOCCHIO, C.; CURTIS, R.; GYLES, C. L. 1992. Amplification of invA gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*, v. 6, p.271-279.

ROCOURT, J., WEHMEYER, U., STACKEBRANDT, E. Transfer of *Listeria denitificans* to a new genus, *Jonesia* gen. Nov. as *Jonesia denitrificans* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 37, p.266-270. 1987.

ROCOURT, J. Risk factors for listeriosis. **Food Control**. p.195-202, 1996.

RÖRVIK, L. M., CAUGANT, D. A., YNDESTAND, M. Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* sp. in a salmon slaughterhouse and smoke salmon processing plant. **Journal Food Microbiology**. n. 25. p.19-27. 1995.

RÖRVIK, L.M., AASE, B., ALVESTAD, T., CAUGANT, D.A. Molecular Epidemiological Survey of *Listeria monocytogenes* in Seafoods and Seafood-Processing Plants. **Applied and Environmental Microbiology**. American Society for Microbiology. Copyright. Vol. 66. N° 11. p. 4779-4784. 2000.

SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K. B., ERLICH, H. A. *Primer*-directed enzymatic amplification with a thermostable DNA polymerase. **Science**. n. 239. p.487-491. 1988.

SCHUCHAT, A., DEEVER, K. A., WENGER, J. D. Role of food in sporadic listeriosis. **Journal American medical association**, v. 267, p.2041-2045. 1992.

SEELIGER, H. P. R., JONES, D. Genus *Listeria* Pirie, 1940. 383AL, In: P. H. A. SNEATH, N. S. MAIR, M. E. SHARPE, AND J. G. HOLT (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 1986. p.1235–1245. vol. 2.

TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal Clinical Microbiology**. v. 33. p. 2233-2239. 1995.

VOGEL, B., F., JORGENSEN, L., V., OJENIYI, B., HUSS, H., H., GRAM, L. Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon produced in different smokehouses as assessed by Random Amplifield Polymorphic DNA analyses. **Journal of Food Microbiology**. n. 65. p.83-92. 2001.

WEAGANT, S. D., SADO, P. N., COLBURD, K. G., TORKELSON, J. D., STANLEY, F. A., KRANE, M. H., SHIELDS, S. C., THAYER, C. F. The incidence of *Listeria* species in frozen seafoods product. **Journal of Food Protection**. n. 51, p.655-657, 1988.

WELSH, J., MaCLELLANS, M. Fingerprinting genomic using PCR with arbitrarily *primers*. **Nucleic Acids Research**. v. 18, n. 24. p.7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A., TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrarily *primers* are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. v. 18, n. 22. p.6531-6535, 1990.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Foodborne listeriosis. **Bulletim of the Word Health Organization**. v. 66. n. 4. p.421-428. 1988.

ANEXOS

Anexo 1- PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA

Fase I:

1. 500 µl de amostra;
2. 1% de SDS (dodecil sulfato de sódio) – 5 µl;
3. 0,2 mg/ml de proteinase K (0,1mg/5 µl) – 50 µl;
4. Homogeneizar no vortex por 10 segundos;
5. Banho Maria à 56°C por 30 minutos.

Fase II: Método de associação das técnicas de fenol/clorofórmio – álcool isoamilico e sílica tiocinato de guanidina, (ALFIERI, 1999).

1. 500 µl da Amostra;
2. 500 µl de fenol/clorofórmio – álcool isoamilico;
3. Homogeneizar no vortex;
4. Banho Maria à 56°C por 15 minutos;
5. Centrifugar a 10.000Xg por 10 minutos;
6. Recolher 500 µl do sobrenadante em outro tubo.

Fase III: Método de sílica/tiocinato de guanidina.

1. 500 µl da amostra;
2. 10 µl de sílica hidratada;
3. 900 µl de solução L6;
4. Homogeneizar no vortex;
5. Agitar durante 30 minutos em temperatura ambiente;
6. Centrifugar a 10.000Xg por 30 segundos;
7. Desprezar o sobrenadante;
8. Adicionar 500 µl de solução L2;
9. Homogeneizar no vortex;
10. Centrifugar a 10.000Xg por 30 segundos;

11. Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M;
12. Adicionar 500 µl de solução L2;
13. Homogeneizar em vortex;
14. Centrifugar a 10.000Xg por 30 segundos;
15. Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M;
16. Adicionar 1 ml de Etanol a 70%;
17. Homogeneizar no vortex;
18. Centrifugar a 10.000Xg por 30 segundos;
19. Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M;
20. Adicionar 1 ml de Etanol a 70%;
21. Homogeneizar no vortex;
22. Centrifugar a 10.000Xg por 30 segundos;
23. Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M;
24. Adicionar 1 ml de acetona PA;
25. Homogeneizar no vortex;
26. Centrifugar a 10.000Xg por 30 segundos;
27. Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M;
28. Secar o pelete em estufa a 37°C por 15 minutos com o tubo aberto;
29. Adicionar 30 µl de água Mili Q autoclavada;
30. Homogeneizar no vortex;
31. Banho Maria a 56°C por 15 minutos;
32. Homogeneizar no vortex;
33. Centrifugar 10.000Xg por 2 minutos;
34. Recolher o sobrenadante;
35. Adicionar 20 µl de água Mili Q autoclavada;
36. Homogeneizar em vortex;
37. Banho Maria a 56°C por 15 minutos;
38. Homogeneizar no vortex;
39. Centrifugar 10.000Xg por 2 minutos;
40. Recolher o sobrenadante.

Anexo 2- LISTA DE REAGENTES

1. Agarose (Gibco BRL[®]);
2. Brometo de Etídio;
3. Cloreto de Magnésio - (Gibco BRL[®]);
4. Dodecil Sulfato Sódico (SDS);
5. dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) - (Gibco BRL[®]);
6. Etanol – álcool etílico absoluto;
7. Fenol/clorofórmio – álcool isoamilico (24:24:1);
8. Isotiocinato de guanidina (Gibco BRL[®]);
9. Padrão 100 bp (Gibco BRL[®]);
10. PCR buffer 10 x (Gibco BRL[®]);
11. *Primers* (Gibco BRL[®]);
12. Sílica (Gibco BRL[®]);
13. Taq DNA polimerase Recombinant – 5U/ μ l (Gibco BRL[®]);
14. TRIS (hidroximetil amino metano) PM: 121,14;
15. Triton x-100.

Anexo 3- PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

Solução de L6

- 120 g de tiocinato de guanidina (GUSCN);
- 100 ml de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4;
- 22 ml de EDTA 0,2 M pH 8,0;
- 2,6 g de Triton x 100.

Solução de L2

- 120 g de tiocinato de guanidina (GUSCN);
- 100 ml de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4.

Tampão de corrida: TEB (TRIS – ácido bórico – EDTA) 10 X []:

- 0,89 M TRIS;
- 0,89 M ácido bórico;
- 0,02 M EDTA dissodium;
- Água bidestilada qsp. 1 litro pH = 8,4.

Fenol/clorofórmio – álcool isoamílico (24:24:1):

- 24 ml fenol saturado;
- 24 ml clorofórmio;
- 1 ml álcool isoamílico.

Hidratação da Sílica

- 60 g de sílica (SIGMA[®]);
- Adicionar 500 ml de Água MiliQ autoclavada;
- Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 horas;
- Por sucção, desprezar 430 ml do sobrenadante;
- Ressuspender a sílica em 500 ml de água bidestilada;
- Manter em repouso durante 5 horas para sedimentar;
- Desprezar 440 ml do sobrenadante;
- Adicionar 600 µl de HCl (32% w/v) para ajustar o pH (pH=2,0);
- Alicotar e autoclavar.

Preparação do gel agarose 1,5%.

- 0,75 g de agarose (Gibco BRL[®]);
- 100 ml água destilada qsp;
- Aquecer até dissolver a agarose.

Anexo 4- DILUIÇÃO DOS *PRIMERS*

Primer LIS 1 (Gibco BRL®):

Sequência: 5'-CCTGATGCAACAAAAGGGAC-3';

Posição: 599 e 618;

Concentração:

Solução de estoque: ressuspender em _____ µl de água MiliQ autoclavada para obter uma solução de 10 x [];

Solução de uso: diluir 1 parte da solução estoque em 9 partes de água MiliQ autoclavada;

Concentração final: 20 pmol/µl.

Primer LIS 2 (Gibco BRL®):

Sequência: 5'- TGATAAAGTTGAGCAGCGGC – 3';

Posição: 1224 e 1205;

Concentração:

Solução de estoque: ressuspender em _____ µl de água MiliQ autoclavada para obter uma solução de 10 x [];

Solução de uso: diluir 1 parte da solução estoque em 9 partes de água MiliQ autoclavada;

Concentração final: 20 pmol/µl.